

FENOTIPIFICACIÓN Y GENOTIPIFICACIÓN DE LA RESISTENCIA
ANTIMICROBIANA DE LAS BACTERIAS GRAM NEGATIVAS DE MAYOR
INCIDENCIA EN PACIENTES ONCOLÓGICOS DEL EJE CAFETERO

LUIS FELIPE PÉREZ MACHADO

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA
PEREIRA
2018

FENOTIPIFICACIÓN Y GENOTIPIFICACIÓN DE LA RESISTENCIA
ANTIMICROBIANA DE LAS BACTERIAS GRAM NEGATIVAS DE MAYOR
INCIDENCIA EN PACIENTES ONCOLÓGICOS DEL EJE CAFETERO

LUIS FELIPE PÉREZ MACHADO

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE MAGÍSTER
EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

DIRECTOR

JOSÉ IGNACIO MONCAYO ORTIZ

MSc MICROBIOLOGÍA

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA

FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

PEREIRA

2018

Nota de aceptación:

Firma del presidente del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

Pereira, _____ de _____ de 2018

DEDICATORIA

A la vida por permitirme avanzar cada día más.

A mis padres, Paola y Gustavo, quienes nunca han dejado de apoyarme y enseñarme, por ustedes he llegado hasta aquí.

A todas las personas que me acompañaron, ayudaron, aguantaron y apoyaron, gracias.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento al profesor José Ignacio Moncayo Ortiz por sus enseñanzas, paciencia y colaboración durante este paso, y al grupo de investigación GRIENI, especialmente a la profesora Yina Marcela Guaca, por la participación en este proyecto.

Agradezco a la Universidad Tecnológica de Pereira por permitirme seguir siendo parte de ella, no solo como estudiante sino como docente, y a la Vicerrectoría de Investigaciones, Innovación y Extensión por el apoyo económico en la realización de este trabajo de grado.

A la clínica Oncólogos del Occidente por la colaboración, el interés y el esfuerzo puestos para avanzar en una solución para una gran problemática de salud pública.

Finalmente, al grupo de trabajo del Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana de la Universidad El Bosque por estar siempre dispuestos a colaborar con lo que necesitara, por abrirme sus puertas y así lograr realizar una parte fundamental de este trabajo.

CONTENIDO

1.	OBJETIVOS	15
1.1.	OBJETIVO GENERAL	15
1.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
2.	MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE	16
2.1.	INFECCIONES ASOCIADAS A LA ATENCIÓN EN SALUD EN PACIENTES ONCOLÓGICOS	16
2.2.	MICROBIOLOGÍA ACTUAL DE LAS INFECCIONES	18
2.3.	PRINCIPALES BACTERIAS CAUSANTES DE IAAS EN PACIENTES ONCOLÓGICOS	18
2.3.1.	<i>Escherichia coli</i>	18
2.3.2.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	21
2.3.3.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22
2.3.4.	<i>Acinetobacter baumannii</i>	24
2.4.	ANTIMICROBIANOS	25
2.5.	MECANISMOS DE RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS	26
2.5.1.	INACTIVACIÓN DEL ANTIMICROBIANO	27
2.5.2.	GENÉTICA DE LA RESISTENCIA ANTIMICROBIANA	28
2.5.3.	RESISTENCIA ANTIMICROBIANA VÍA TRANSFERENCIA HORIZONTAL DE GENES	28
2.6.	PRINCIPALES ANTIMICROBIANOS EMPLEADOS CONTRA LAS IAAS	29
2.6.1.	β -LACTÁMICOS	29
2.6.2.	CARBAPENÉMICOS	39
2.6.3.	QUINOLONAS	41
2.6.4.	SULFONAMIDAS	45
2.6.5.	AMINOGLUCÓSIDOS	46
2.7.	DIAGNÓSTICO	48
2.7.1.	LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	49
2.8.	DESARROLLO DEL PROYECTO	49
3.	METODOLOGÍA	50
3.1.	TIPO DE ESTUDIO	50
3.2.	POBLACIÓN	50

3.3.	CRITERIOS DE INCLUSIÓN	50
3.4.	CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	50
3.5.	TAMAÑO DE LA MUESTRA	50
3.6.	TOMA DE LA MUESTRA	51
3.7.	IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA Y PERFIL DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA POR SISTEMAS AUTOMATIZADOS.....	51
3.8.	TÉCNICAS MOLECULARES.....	51
3.8.1.	EXTRACCIÓN DE ADN	51
3.8.2.	CONFIRMACIÓN DE LA ESPECIE POR DETECCIÓN DE LOS GENES ESPECÍFICOS DE ESPECIE.....	52
3.8.3.	DETECCIÓN DE LOS GENES DE RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS	52
3.9.	ESTABLECIMIENTO DE LA CORRELACIÓN QUE EXISTE ENTRE EL TRATAMIENTO EMPÍRICO SELECCIONADO VERSUS EL QUE DEBERÍA SELECCIONARSE SEGÚN LA RESISTENCIA FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA.....	54
3.10.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	54
3.11.	DECLARACIÓN BIOÉTICA.....	54
3.12.	ASPECTOS AMBIENTALES	55
3.13.	ASPECTOS DE SEGURIDAD E HIGIENE INDUSTRIAL	55
4.	RESULTADOS.....	56
4.1.	RESULTADOS DE LOS DATOS DEMOGRÁFICOS	56
4.2.	CONFIRMACIÓN DE LA ESPECIE.....	56
4.3.	CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS AISLAMIENTOS	58
4.4.	DETECCIÓN DE LOS GENES DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA.....	60
4.5.	ANÁLISIS COMPARATIVO ENTRE LA RESISTENCIA FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA A LOS ANTIMICROBIANOS	63
4.6.	ANÁLISIS DE LA CORRELACIÓN QUE EXISTE ENTRE EL TRATAMIENTO EMPÍRICO SELECCIONADO VERSUS EL QUE DEBERÍA SELECCIONARSE SEGÚN LA RESISTENCIA FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA.....	63
5.	DISCUSIÓN.....	67
6.	CONCLUSIONES	75
7.	RECOMENDACIONES	77
8.	BIBLIOGRAFÍA	78

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características de riesgo de infección en pacientes con leucemia y linfoma en relación con tumores sólidos	17
Tabla 2. Mecanismos de acción de los antimicrobianos y ejemplos de cada tipo.	26
Tabla 3. Clasificación de las β -lactamasas.....	34
Tabla 4. Iniciadores para la detección de genes especie específicos para <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> y <i>A. baumannii</i>	52
Tabla 5. Iniciadores para la detección de los genes asociados a resistencia a los antimicrobianos para <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> y <i>A. baumannii</i>	53
Tabla 6. Distribución de los aislamientos por especie, género, tipo de muestra clínica y lugar de procedencia.	56
Tabla 7. Resistencia fenotípica a los antimicrobianos probados por el método automatizado.	59
Tabla 8. Resistencia genotípica a los antimicrobianos por PCR simples y múltiples	62
Tabla 9. Análisis estadístico comparativo entre la resistencia fenotípica y genotípica. .	63
Tabla 10. Análisis estadístico comparativo entre la resistencia fenotípica y genotípica y el tratamiento empírico.	64
Tabla 11. Análisis estadístico comparativo entre la resistencia fenotípica y genotípica y el tratamiento empírico de <i>E. coli</i>	65
Tabla 12. Análisis estadístico comparativo entre la resistencia fenotípica y genotípica y el tratamiento empírico de <i>P. aeruginosa</i>	65
Tabla 13. Análisis estadístico comparativo entre la resistencia fenotípica y genotípica y el tratamiento empírico de <i>K. pneumoniae</i>	66
Tabla 14. Análisis estadístico comparativo entre la resistencia fenotípica y genotípica y el tratamiento empírico de <i>A. baumannii</i>	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sustituciones de los aminoácidos en BLEE derivadas de TEM.	37
Figura 2. Sustituciones de los aminoácidos en BLEE derivadas de SHV.....	38
Figura 3. PCR para la detección del gen <i>uidA</i> para la identificación de <i>E. coli</i>	57
Figura 4. PCR para la detección del gen <i>oprL</i> para la identificación de <i>P. aeruginosa</i>	57
Figura 5. PCR para la detección del gen <i>Khe</i> para la identificación de <i>K. pneumoniae</i>	58
Figura 6. PCR múltiple para los genes de resistencia a β -lactámicos <i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{TEM}</i> y <i>bla_{CTX-M}</i>	60
Figura 7. PCR múltiple para los genes de resistencia a sulfonamidas <i>sul1</i> y <i>sul 2</i>	61
Figura 8. PCR para el gen de resistencia a aminoglucósidos <i>aac(6')-Ib</i>	62

RESUMEN

Las infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS) son las infecciones relacionadas a la atención en salud sin importar su contexto entre los cuales se encuentran los hospitales, centros de hospitalización e instalaciones comunitarias. Los pacientes oncológicos son más susceptibles a contraer IAAS, aumentando esta problemática en pacientes en estado crítico. Alrededor del 60% de las muertes de pacientes oncológicos se relacionan con IAAS. Por ello es importante la identificación, la prevención y la selección correcta de los tratamientos contra estas infecciones, teniendo en cuenta la resistencia antimicrobiana.

El propósito de este estudio fue establecer y comparar la resistencia antimicrobiana genotípica y fenotípica de los aislamientos de bacterias Gram negativas más comunes causantes de IAAS en instituciones hospitalarias oncológicas del Eje Cafetero y contrastar estos resultados con el tratamiento empírico de los pacientes.

Se realizó un estudio fenotípico que identificó los aislamientos y su resistencia por métodos automatizados y un estudio genotípico con un componente molecular que identificó genes de especie y genes de resistencia de 114 aislamientos de bacterias Gram negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Acinetobacter baumannii*) aisladas de pacientes oncológicos del Eje Cafetero. Los especímenes clínicos fueron identificados por métodos microbiológicos automatizados en los centros médicos y por PCR en los laboratorios de microbiología de la Universidad Tecnológica de Pereira. La determinación genotípica de los genes de resistencia a β -lactámicos, carbapenémicos, sulfonamidas, quinolonas y aminoglucósidos fue determinada por PCR múltiple. Se elaboraron tablas de contingencia y se analizaron diferentes correlaciones entre la resistencia fenotípica, la resistencia genotípica y el tratamiento empírico de los pacientes.

Los resultados mostraron que 35,1% (40/114) de los aislamientos correspondieron a *E. coli*, 31,6% (36/114) *P. aeruginosa*, 29,9% (34/114) *K. pneumoniae* y 3,5% (4/114) *A. baumannii*. Por género, el 51,8% (59/114) de los aislamientos fueron de pacientes masculinos, según el tipo de muestra los aislamientos de sangre fueron los más comunes con 56,1% (64/114), seguido de orina con 32,5% (37/114). Por la procedencia de los aislamientos el aporte de cada ciudad fue: Pereira 82,3% (71/114), Armenia 24,8% (28/114) y Manizales 8,8% (10/114).

Fenotípicamente, en la resistencia por grupo de antimicrobianos, la mayor fue a los β -lactámicos, con 79,8% (91/114). Los antimicrobianos con menor resistencia fenotípica fueron los carbapenémicos y las sulfonamidas, ambos con 25,4% (29/114). *E. coli*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* presentaron multirresistencia.

La resistencia genotípica a β -lactámicos fue la más alta, con 70,2% (80/114). La resistencia a carbapenémicos fue 29% (33/114), a sulfonamidas 45,6% (52/114) y a aminoglucósidos 40,4% (46/114). Los genes de resistencia que más se detectaron fueron *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *sul1*. Genotípicamente no se encontró resistencia a quinolonas dada por el gen *qnr*.

En general, las tasas de resistencia a los antimicrobianos fueron mayores a las reportadas en otras zonas geográficas del país. En los aislamientos estudiados predominó el patrón de la multirresistencia en todas las especies estudiadas. Las mayores discrepancias en el tratamiento empírico versus los resultados de la resistencia *in vitro* se dieron a nivel fenotípico para sulfonamidas (66,67%) y a nivel genotípico para β -lactámicos (36,84%).

En conclusión, se estableció la prevalencia fenotípica y genotípica de la resistencia en los aislamientos obtenido de pacientes oncológicos, siendo alta frente a los datos reportados en otros estudios en el país. Se analizó la relación entre la resistencia fenotípica y genotípica observándose diferencia significativas en todos los grupos de antimicrobianos en el estudio. Las discrepancias entre la resistencia *in vitro* y el tratamiento empírico de los pacientes oncológicos evidencia la necesidad de establecer protocolos que tengan en cuenta susceptibilidad antimicrobiana para tener la posibilidad de corregir la conducta terapéutica en el caso de fracaso en el tratamiento empírico.

Palabras clave: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, resistencia antimicrobiana, cáncer.

ABSTRACT

The infections associated with the attention in health (HAI) are the infections related to the attention in health, without importing its context, between which there are the hospitals, centers of hospitalization and community facilities. The oncological patients are more capable to contract HAI, increasing these problems in patients in the critical state. About 60 % of the deaths of oncological patients are related to HAI. That's why there is important the identification, the prevention and the correct selection of the treatments against these infections, bearing in mind the antimicrobial resistance.

The objective of this study was to establish and to compare the antimicrobial resistance of the Gram negative bacteria more common of HAI in oncological institutions of the Eje Cafetero and to correlate these results with the empirical treatment of the patients.

The phenotypic study identified the isolates and its resistance by automated methods and a genotypic test with a molecular component identified genes of species and genes of resistance of 114 isolates of Gram-negative bacteria (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Acinetobacter baumannii*) isolated from cancer patients of the Eje Cafetero. The bacteria were cultured and identified by automated microbiological methods in the medical centers and by PCR in the Microbiology Laboratory of the Universidad Tecnológica de Pereira. The genotype determination of the resistance genes was determined by PCR. Contingency tables were developed and analyzed the correlations between phenotypic resistance, the genotypic resistance and the empirical treatment of patients.

The results showed that 35.1% (40/114) of the isolates corresponded to *E. coli*, 31.6% (36/114) to *P. aeruginosa*, 29.9% (34/114) to *K. pneumoniae* and 3.5% (4/114) to *A. baumannii*. By gender, the 51.8% (59/114) of the isolates were from male patients, according to the type of sample, blood isolates were most common with 56.1% (64/114), followed by urine with 32.5% (37/114).

Phenotypically, the greatest resistance was to β -lactams, with 79.8% (91/114). Antimicrobial resistances with less phenotypic resistance were the carbapenems, and sulfonamides, both with 25.4% (29/114). *E. coli*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae* showed multidrug resistance.

The genotypic resistance to β -lactams was the highest, with 70.2% (80/114). The resistance to carbapenems was 29% (33/114), 45.6% to sulfonamides (52/114) and 40.4% (46/114) to aminoglycosides). The resistance genes that were higher detected were *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}* and *sul1*. Genotypically it was not found quinolone resistance given by the *qnr* gene.

In general, the rates of resistance to antimicrobials were higher than those reported in other geographical areas of the country. In the isolates studied the prevailing pattern of multidrug resistance was in all species. The major discrepancies in the empirical treatment versus the results of the resistance in vitro phenotypic level were to sulfonamides (66.67%) and genotypic level for β -lactam (36.84%).

In conclusion, it was establish the prevalence of the phenotypic and genotypic resistance in the isolates obtained from cancer patients. We analyzed the relationship between the phenotypic and genotypic resistance, and significant difference was observed in all groups of antimicrobials in the study.

Key words: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, antimicrobial resistance, cancer.

INTRODUCCIÓN

Una infección asociada a la atención en salud (IAAS) es una infección localizada o sistémica desencadenada por una reacción adversa a la presencia de uno o más agentes infecciosos o sus toxinas sin que haya evidencia de su previa presencia al momento de ingresar en el centro de atención en salud respectivo. Convencionalmente, se considera que una infección es una IAAS si se manifiesta al menos 48 horas después del ingreso [1].

Las IAAS se presentan tanto en países desarrollados como en naciones en desarrollo; diariamente aproximadamente 1,4 millones de pacientes adquieren IAAS. La CDC (*Center for Disease Control and Prevention*, por sus siglas en inglés) estima, que tan solo en Estados Unidos anualmente hay 99.000 muertes asociadas a IAAS. Las mayores morbilidades se dan entre pacientes hospitalizados en Unidades de Cuidado Intensivo (UCI) [1].

A pesar de que en las últimas décadas, los avances en el cuidado de los pacientes oncológicos han resultado en un aumento de la supervivencia, las complicaciones debidas a infecciones siguen siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad. Estudios han demostrado que alrededor del 60% de las muertes de pacientes oncológicos están relacionadas con infecciones. A pesar de que existen pocos datos sobre la mortalidad infecciosa en pacientes con tumores en órganos sólidos, se estima que aproximadamente el 50% de estos pacientes tienen como causa primaria de muerte una infección [2], [3]. En años recientes se ha observado el aumento de infecciones causadas por bacterias Gram negativas, y aunque las causas de este comportamiento aún no están claras, se ve una clara relación con la resistencia antimicrobiana.

Para lograr una identificación, tratamiento y prevención exitosa de las infecciones, es importante conocer a profundidad los mecanismos de resistencia presentes en los patógenos comúnmente encontrados en los pacientes oncológicos. Aun así, a medida que las modalidades terapéuticas continúen evolucionando, la resistencia a antimicrobianos continúe aumentando y nuevos patógenos sean descubiertos, el manejo de las infecciones continuará presentando retos en los años venideros [2], [4].

Con esta investigación se pretendió identificar la relación entre la resistencia fenotípica y los genes de resistencia presentes en los aislamientos bacterianos de pacientes oncológicos del Eje Cafetero para compararlos con el tratamiento empírico que reciben los pacientes oncológicos, y de esta manera conocer la situación actual y contribuir a la implementación de medidas costo-efectivas de control enfocadas al uso de antimicrobianos y el manejo de infecciones en pacientes oncológicos.

1. OBJETIVOS

1.1.OBJETIVO GENERAL

Determinar la prevalencia fenotípica y genotípica de la resistencia antimicrobiana de bacterias Gram negativas en pacientes oncológicos del Eje Cafetero.

1.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar el perfil fenotípico de la resistencia antimicrobiana en *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Acinetobacter baumannii*.
- Detectar el perfil genotípico de la resistencia antimicrobiana para *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*.
- Comparar la resistencia fenotípica y genotípica de β -lactámicos, carbapenémicos, quinolonas, sulfonamidas y aminoglucósidos en *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*.
- Establecer la correlación que existe entre el tratamiento empírico seleccionado versus el que debería seleccionarse según la resistencia fenotípica y genotípica.

2. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

2.1. INFECCIONES ASOCIADAS A LA ATENCIÓN EN SALUD EN PACIENTES ONCOLÓGICOS

Las infecciones en pacientes oncológicos son una problemática mundial, para ello se han desarrollado sistemas de vigilancia epidemiológica que buscan determinar la frecuencia de las principales infecciones, el comportamiento de la resistencia, el uso y consumo de antimicrobianos, prevalencia de la resistencia, la relación que existe entre los pacientes y los patógenos y finalmente, el perfil genético de virulencia y las características moleculares de los aislamientos bacterianos, con el fin de hacer una detección temprana de los perfiles de resistencia e implementar mejores y más rápidas medidas de control [5], [6].

Las complicaciones infecciosas constituyen una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en los pacientes oncológicos. Las alteraciones en las defensas del paciente, ya sea producidas por la propia enfermedad o por los tratamientos a los que son sometidos, va a provocar un incremento significativo en el riesgo de sufrir infecciones [7]. Uno de los progresos más destacables de la medicina en años recientes es el incremento de la expectativa de vida de los pacientes oncológicos. Esto es debido a la combinación de diferentes medidas terapéuticas como la quimioterapia más intensiva, el trasplante de médula, las transfusiones de plaquetas, el uso de estimuladores de colonias de granulocitos, la disponibilidad de catéteres intravasculares y el desarrollo de antimicrobianos con uso terapéutico o preventivo. Sin embargo, el incremento de la supervivencia durante periodos de profunda inmunosupresión ha hecho de las infecciones una complicación frecuente y devastadora [8].

Muchas de las medidas justificadas para prevenir complicaciones, son finalmente usadas para justificar riesgos terapéuticos mayores con el consiguiente incremento de complicaciones hemorrágicas, disrupción de mucosas, fallas multiorgánicas e infecciones. Existen diferencias importantes entre las enfermedades hematológicas y los tumores sólidos, fundamentalmente en relación con la incidencia y severidad de las complicaciones infecciosas [8].

Los tumores sólidos son mucho más comunes que las neoplasias hematológicas. Aunque la neutropenia severa y prolongada es común, varios factores aumentan el riesgo de infección en pacientes con tumores sólidos y la presencia de múltiples factores de riesgo en el mismo paciente no suelen ser comunes (tabla 1). Dentro de estos factores se encuentran las obstrucciones (generalmente causadas por la progresión del tumor), la ruptura de barreras anatómicas naturales como la piel y las

mucosas superficiales, y factores asociados a los tratamientos como la quimioterapia, la radiación, el diagnóstico y/o procedimientos quirúrgicos, y el incremento en el uso de dispositivos médicos variados como catéteres, *stents* y prótesis [9].

Tabla 1. Características de riesgo de infección en pacientes con leucemia y linfoma en relación con tumores sólidos [8].

Neutropenia más intensa y prolongada
Mucositis más severas
Asociación de neutropenia, mucositis e inmunosupresión celular
Diátesis hemorrágicas con afectación cutánea y de mucosas
Menor disfunción de órganos
Mayor uso de antimicrobianos, de reacciones alérgicas e interacciones

El *National Cancer Institute* (<https://www.cancer.gov/>) ha definido los tumores sólidos como masas no quísticas (tanto benignas como malignas) incluyendo carcinomas, linfomas y sarcomas. Se ha estimado que 1.685.210 nuevos casos de cáncer fueron diagnosticados tan solo en los Estados Unidos en 2016, con un estimado de 14 millones de casos nuevos en todo el mundo [10]. La gran mayoría de estos casos son tumores sólidos, siendo los más comunes el cáncer de mama, pulmones y bronquios, próstata, colon y recto, y vejiga urinaria, mientras que las leucemias representan aproximadamente el 4% de los casos. Las infecciones son las complicaciones más comunes en pacientes con cáncer, y ocurren como resultado de la malignidad subyacente y de las diversas modalidades usadas para el tratamiento. A pesar del hecho que los tumores sólidos son mucho más comunes, las infecciones en pacientes con estos tumores no han sido tan estudiadas como en pacientes con malignidades hematológicas [11], [12]. A diferencia de estas últimas patologías, los pacientes con tumores sólidos no son significativamente inmunosuprimidos y no experimentan periodos prolongados de neutropenia. En su lugar, los factores que aumentan el riesgo de infección en estos pacientes incluyen daños a las barreras anatómicas naturales, fenómenos obstructivos (comunes en pacientes con cáncer de pulmón, hepato-biliar, pancreático, tumores intestinales, prostáticos y ginecológicos), procedimientos quirúrgicos, quimioterapia, radiación, disfunciones del sistema nervioso central, factores nutricionales y el uso de dispositivos médicos [9]. Los sitios comunes de infección incluyen el tracto respiratorio, el torrente sanguíneo, el tracto urinario y la piel (incluyendo infecciones del sitio quirúrgico). En años recientes, la epidemiología de la mayoría de estas infecciones ha cambiado con la aparición de organismos resistentes. En consecuencia, se necesita desarrollar nuevos enfoques terapéuticos, basados en las epidemias locales y los perfiles de susceptibilidad/resistencia. Además, la prevención de infecciones, el control de las infecciones y la administración de antimicrobianos son estrategias importantes y a menudo infravaloradas y descuidadas en este entorno [13].

Más del 80% de las infecciones en pacientes oncológicos son causadas por microorganismos pertenecientes a la microbiota endógena del individuo. En estos pacientes, la microbiota endógena inocua es sustituida por nuevos microorganismos adquiridos en los centros hospitalarios hasta en el 50% de los casos y que son los causantes de las IAAS [14].

2.2. MICROBIOLOGÍA ACTUAL DE LAS INFECCIONES

La mayoría de las infecciones en pacientes con tumores son causadas por la microbiota de los pacientes residentes. En consecuencia, la distribución de los organismos causantes de las infecciones son reflejo de la microbiota del sitio de la infección [15]. La adquisición de IAAS generalmente ocurre varios días después de la hospitalización, aunque, en los últimos años, el sitio de cuidado se ha desplazado en gran medida a clínicas y centros de oncología, donde estas infecciones son de común adquisición. La exposición prolongada a múltiples antimicrobianos, lo que ocurre comúnmente en pacientes con tumores sólidos, conduce a la selección de organismos resistentes. Las diferencias geográficas y locales que existen entre las instituciones en cuanto a su microbiología y patrones de susceptibilidad/resistencia no son infrecuentes y siempre deben tenerse en cuenta a elegir tratamientos empíricos.

2.3. PRINCIPALES BACTERIAS CAUSANTES DE IAAS EN PACIENTES ONCOLÓGICOS

2.3.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli es un bacilo Gram negativo increíblemente diverso que posee la habilidad de colonizar y sobrevivir en numerosos nichos, tanto ambientales como en animales hospederos. Esta bacteria a menudo forma relaciones simbióticas con su hospedero al colonizar la mucosa intestinal, proporcionando nutrientes, generando señales de regulación inmunes e inclusive protección contra patógenos [16]. Sin embargo, *E. coli*, se ha convertido en un patógeno bien adaptado a través de la obtención y pérdida de genes. Algunas especies patógenas de *E. coli* causan diarrea (*E. coli* patógena intrainestinal), mientras que otras causan infecciones extraintestinales (*E. coli* patógena extraintestinal (ExPEC)). Estos grupos de *E. coli* patógena se clasifican en ocho biotipos entre los cuales se encuentran: *E. coli* entéropatógena (EPEC), enterohemorrágica (EHEC), enterotoxigénica (ETEC), enteroinvasiva (EIEC), enteroagregativa (ECEA), uropatógena (UPEC), adherente difusa (DAEC) y *E. coli* K1 causante de meningitis neonatal (NMEC) [17].

E. coli es uno de los microorganismos más importantes en la epidemiología clínica y la principal causa de infecciones en el tracto urinario, tanto IAAS, como adquiridas en la

comunidad. Además, posee una gran capacidad de diversificación que le permite la formación de nuevos grupos genéticos y clones. La incidencia mundial de infecciones por esta bacteria ha ido en aumento, afectando a millones de personas y presentando niveles de morbilidad y mortalidad considerables en casos de complicaciones y sepsis [18]. En Colombia, los datos que han sido reportados por 35 instituciones que pertenecen a la red de vigilancia del grupo para el control de la resistencia antimicrobiana en Bogotá (GREBO) en el 2010, indican que *E. coli* ocupa el primer lugar en frecuencia de microorganismos aislados en servicios no UCI y el quinto lugar en UCI.

Esta bacteria adquiere sus mecanismos de resistencia por transferencia horizontal de elementos genéticos móviles, codificando enzimas que mutan sitios de reconocimiento del antimicrobiano para impedir su unión, o sistemas que disminuyen la concentración intracelular del mismo [19]. El mecanismo de resistencia más frecuente es el mediado por β -lactamasas, capaces de hidrolizar antibióticos derivados de las penicilinas. Las β -lactamasas pueden ser de amplio espectro (BLAE) o β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) [20], [21], [22]. Los mecanismos de resistencia presentados en *E. coli* pueden ser transferidos simultáneamente con otros genes que confieren resistencias a otro tipo de antibióticos.

La primera β -lactamasa fue identificada en *Escherichia coli* inclusive antes del lanzamiento de la penicilina para su uso médico. La producción de β -lactamasas en patógenos Gram negativos es el factor de contribución más importante a la resistencia de β -lactámicos [23]. Los cuatro principales grupos de β -lactámicos son las penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos. Todos poseen un anillo β -lactámico, el cual puede ser hidrolizado por β -lactamasas, obteniendo compuestos sin ninguna actividad antimicrobiana. La constante exposición de cepas bacterianas a los β -lactámicos ha resultado en la sobreproducción y mutación continua de β -lactamasas, que ahora son capaces de hidrolizar penicilinas, cefalosporinas de amplio espectro y monobactámicos [23]. Estas nuevas enzimas son llamadas β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), las cuales permanecen en el espacio periplasmático donde atacan al antimicrobiano antes de que este alcance su sitio de acción.

Muchas bacterias Gram negativas producen β -lactamasas cromosómicas, las cuales pudieron haber evolucionado como proteínas protectoras contra las β -lactamasas producidas naturalmente por organismos del ambiente. Las β -lactamasas han incrementado en número y diversificación principalmente por el uso indiscriminado de antimicrobianos β -lactámicos en tratamientos que no los necesitan [23]. Existen cuatro familias principales de β -lactamasas TEM (Temoneira), SHV (Sulfhidril Variable), CTX-M (Cefotaxima) y OXA (Oxacilina). La propagación de la producción de β -lactamasas

puede ser mediado por cromosomas o plásmidos, inclusive pueden encontrarse genes codificantes en transposones e integrones. Un ejemplo de esto son los genes para TEM, que se encuentran en transposones, mientras los que codifican SHV se aíslan principalmente de cromosomas pero también se pueden encontrar en plásmidos. Los genes para los demás tipos de β -lactamasas se encuentran generalmente en integrones.

Las cepas resistentes a quinolonas aparecen en los centros hospitalarios como resultado de la terapia con estos agentes. A principios de la década de los años 90 era infrecuente hallar resistencia a las quinolonas en los aislamientos clínicos de *E. coli* pero, desde entonces, su frecuencia se incrementó en todo el mundo [24].

Las quinolonas son los antimicrobianos que han tenido mayor desarrollo en los últimos años. Poseen buena actividad contra organismos Gram negativos y alguna contra Gram positivos. Las fluoroquinolonas son medicamentos antimicrobianos que se unen con topoisomerasa tipo II (DNA girasa y topoisomerasa IV) para inhibir la religación del ADN luego del corte enzimático. Son medicamentos muy útiles, especialmente para infecciones del tracto urinario por enterobacterias [25]. Las fluoroquinolonas se encuentran entre los antimicrobianos más comúnmente prescritos gracias a su amplio espectro de actividad, por esto se ha presentado un aumento a nivel mundial de resistencia a estos medicamentos en patógenos Gram negativos. La resistencia antimicrobiana a quinolonas es mediada por la mutación de genes cromosómicos que codifican DNA girasa y/o topoisomerasa IV, o por la mutación de genes que regulan la expresión de bombas de eflujo [26]. Aun así, se ha demostrado que la resistencia a estos antimicrobianos puede mediar mediante plásmidos que otorgan resistencia a múltiples fármacos, a través de los determinantes *qnr*, siendo los principales *qnrA*, *qnrB*, *qnrC* y *qnrS* [26], [25].

Las sulfonamidas fueron los primeros agentes antibacterianos eficaces empleados en el tratamiento de las infecciones en el hombre. Inicialmente poseían actividad frente a una gran variedad de microorganismos Gram positivos y Gram negativos pero posteriormente se desarrolló una amplia resistencia. La resistencia a sulfonamidas es un fenómeno creciente y generalizado y cuando se presenta afecta a todos los componentes del grupo [27].

Las sulfonamidas son antimicrobianos bacteriostáticos muy usados para el tratamiento de infecciones, son análogos estructurales del ácido para amino benzoico, el cual inhibe competitivamente la actividad de la dihidropteroato sintasa, la enzima bacteriana que origina la incorporación del ácido para-amino benzoico en el ácido dihidropteróico, el precursor inmediato del ácido fólico, un metabolito importante para la síntesis de ADN.

Una dihidropteroato sintasa de baja afinidad por sulfonamidas es codificada por un plásmido que tiene un gran potencial de transferencia a otros microorganismos. Además, se conocen los genes de resistencia a sulfonamidas *sul1*, *sul2* y *sul3*, los cuales sintetizan dihidropteroato sintasa resistente a sulfonamidas [28], debido a estos se ha reportado una alta prevalencia de resistencia a sulfonamidas en bacterias Gram negativas a nivel mundial [28].

2.3.2. *Klebsiella pneumoniae*

Es un bacilo Gram negativo no esporulado perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. Es un patógeno oportunista, encontrado en humanos y otros mamíferos, colonizando el tracto gastrointestinal, la piel y en la nasofaringe [29]. Es causante común de neumonía, bacteriemia e infecciones del tracto urinario tanto en la comunidad como en los centros hospitalarios [30]. Este microorganismo presenta varios factores de virulencia como: el antígeno capsular K, usado para evadir la fagocitosis y la activación del complemento, sideróforos que facilitan la captación de hierro del ambiente y de células eucariotas y por último, el pili, utilizado para la adherencia a otras células.

La NHSN (*National Healthcare Safety Network*) reportó en el año 2008 que la frecuencia de *K. pneumoniae* como agente causante de infecciones urinarias fue de 7.7%, neumonías asociadas al ventilador 7,5%, bacteriemia asociada a catéter central 4,9% e infecciones del sitio operatorio con 3,0%. Adicionalmente los aislamientos obtenidos presentaron resistencia a cefalosporinas de tercera generación, a fluoroquinolonas y a carbapenémicos [31]. Recientemente, un estudio realizado en Egipto, reportó que el 33,5% de las infecciones asociadas a catéter fueron causadas por bacterias Gram negativas, y entre estas la prevalencia de BLEE en *K. pneumoniae* fue de 56%, y de igual manera en los Estados Unidos se ha reportado que el 10% de estos aislamientos poseen carbapenemasas [32].

Según GREBO, en Colombia en el 2010 *K. pneumoniae* fue el principal patógeno aislado en UCI adultos, seguido de *S. aureus*, y el segundo microorganismo por fuera de UCI después de *E. coli*. Este patógeno despierta un gran interés epidemiológico gracias a su amplia distribución en el ambiente hospitalario, pero además por su perfil de multirresistencia a los principales antibióticos de amplio espectro usados en las instituciones médicas para el control de infecciones bacterianas complejas.

El principal mecanismo de resistencia presentado por *K. pneumoniae* es la producción BLEE, las cuales hidrolizan diferentes tipos de antimicrobianos β -lactámicos, como penicilinas, cefalosporinas de primera, segunda, tercera y cuarta generación. Los genes que codifican estas enzimas pueden ser transferidos entre diferentes especies

bacterianas por medio de elementos genéticos móviles. Las β -lactamasas más comunes para esta bacteria son las tipo SHV, TEM y OXA [33] [29]. Otro mecanismo de resistencia muy importante es la presencia de carbapenemasas, una familia de enzimas que pueden hidrolizar antimicrobianos carbapenémicos tales como imipenem, meropenem, ertapenem e incluso la mayoría de β -lactámicos. La resistencia a β -lactámicos puede incrementar al presentarse una combinación de β -lactamasas y la pérdida de permeabilidad de la membrana externa. Cabe resaltar a la β -lactamasa NDM (*New Delhi metallo- β -lactamase*), puesto que posee actividad hidrolítica sobre todas las penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos. Esta se identificó en aislamientos de *K. pneumoniae* y *E. coli* entre el 2008 y el 2009, su diseminación ha sido muy exitosa debido a la presencia del gen *bla_{NDM}* en diferentes tipos de plásmidos [34]. Otra carbapenemasa muy importante es la denominada KPC (carbapenemasa de *K. pneumoniae*), la cual tiene una aparición reciente, pero ha tenido una distribución mundial y se asocia a los brotes hospitalarios principalmente [35]. En Colombia fue identificada la variante KPC-2 en el año 2005, sin embargo más recientemente se reportó KPC-3 en un estudio en una institución de tercer nivel en Colombia [36] [37].

También se han reportado en aislamientos de *K. pneumoniae* otro tipo de BLEE como VIM y CTX que confieren resistencia a penicilinas, monobactámicos, cefalosporinas de primera y segunda generación [23]; [38].

Varias cepas de *K. pneumoniae* productoras de β -lactamasas se encuentran asociadas a la resistencia a otros antimicrobianos como aminoglucósidos y fluoroquinolonas, mediados por múltiples mecanismos, incluyendo la adquisición de nuevos genes de metabolización de antibióticos, mutaciones de las proteínas de membrana o estructuras diana y la expresión de bombas de eflujo *ArcA – KocC* [39]. Para aminoglucósidos se presentan enzimas modificadoras del antimicrobiano como la acetil-transferasa AAC(6')-Ib y las 16S rARN metilasas, las cuales son el mecanismo más importante en resistencia a aminoglucósidos en cepas de *K. pneumoniae* [40] [41].

2.3.3. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno oportunista, omnipresente y versátil, responsable de muchas enfermedades infecciosas en varios organismos incluidos insectos, animales, plantas y humanos. Puede encontrarse en ambientes muy variados, desde el suelo y el agua hasta en dispositivos médicos. Esta bacteria es una causa importante de infecciones crónicas y fatales en pacientes hospitalizados, especialmente en aquellos inmunocomprometidos, incluyendo las víctimas de quemaduras, de fibrosis quística y pacientes con cáncer o SIDA [42].

Las infecciones asociadas a aislamientos multirresistentes de *P. aeruginosa* aumentan la morbilidad, mortalidad, necesidad de intervenciones quirúrgicas, largas estancias hospitalarias y mayores costos de tratamiento [43] [44]. *P. aeruginosa* es una de las bacterias más importantes con reportes de múltiples resistencias a antimicrobianos, incluyendo β -lactámicos, carbapenémicos, aminoglucósidos y fluoroquinolonas [45]. Debido a su resistencia antimicrobiana tanto intrínseca como adquirida, solo una gama limitada de medicamentos es efectiva para el tratamiento de infecciones causadas por *P. aeruginosa*. Entre estos medicamentos, los carbapenémicos son los β -lactámicos más potentes contra bacilos Gram negativos, incluyendo *P. aeruginosa*, debido a su alta afinidad a proteínas de unión a penicilinas, su estabilidad frente β -lactamasas de espectro extendido y a su permeabilidad en membranas bacterianas.

Esta bacteria puede desarrollar resistencia a los antimicrobianos por medio de dos mecanismos principales: por la adquisición de genes de resistencia a través de elementos génicos móviles (plásmidos, transposones e integrones insertados) y por procesos mutacionales que alteran la regulación de proteínas constitutivas, lo que disminuye o aumenta su expresión.

El principal mecanismo de resistencia a antimicrobianos β -lactámicos se debe a la producción de β -lactamasas, principalmente las pertenecientes a las familias PSE (original de *Pseudomonas*), CARB (*carbenicillin-hydrolyzing*) y TEM (Temoniera), pero también se han detectado variantes de las familias SHV, CTX y OXA [46] [47]. Además, tiene una cefalosporinasa tipo AmpC inducible, que se expresa en bajas concentraciones en condiciones normales sin producir resistencia, pero cuando esta enzima se sobre expresa, proporciona resistencia a todos los antibióticos β -lactámicos, a excepción de carbapenémicos.

Por su parte, la resistencia a aminoglucósidos en *P. aeruginosa* está mediada por enzimas modificadoras del antimicrobiano [48], de los tipos acetil, fosforil y nucleotidil transferasas, que pueden ser codificadas plasmídica o cromosómicamente. Los genes asociados a la resistencia a aminoglucósidos más comunes son *aac(6')-II*, *aac(3)-Ia*, *aac(3)-Ib*, *aac(3)-Ic*, *ant(2'')-I*, *aph(3')-I* y *aph(3')-II*. Las aminoglucósido 6'-N-aciltransferasas (*aac(6')s*) son de particular interés porque pueden modificar medicamentos como la amikacina, gentamicina, netilmicina y tobramicina [48]. Estas enzimas confieren resistencia mediante la acetilación del antimicrobiano. Hasta la fecha, se han registrado 43 genes asociados a resistencia de aminoglucósidos por enzimas modificadoras, designados desde *aac(6')-Ia* hasta *aacA43*. De acuerdo a varias fuentes a nivel mundial, se ha encontrado que alrededor del 20% a 35% de los aislamientos de *P. aeruginosa* presentan resistencia a fluoroquinolonas, a partir de mutaciones en los genes *gyrA* y *parC*, los cuales codifican DNA girasa A y

topoisomerasa IV, respectivamente. Simultáneamente se han reportado mutaciones en los genes *gyrB* y *parE*, aunque en menor frecuencia [49].

2.3.4. *Acinetobacter baumannii*

Es un cocobacilo Gram negativo, no fermentador de lactosa, que se encuentra distribuido ampliamente en el ambiente y se comporta como un patógeno oportunista, que puede ser responsable de infecciones en heridas no tratadas adecuadamente [50]. En las últimas décadas se ha convertido en un patógeno de mucha importancia clínica a nivel mundial por el aumento en el número de infecciones que produce en pacientes hospitalizados [50]. Causa infecciones principalmente en el tracto respiratorio, asociadas a ventilación asistida, y en el torrente sanguíneo, piel y tejidos blandos. Esta bacteria es un problema de importancia en las instituciones hospitalarias debido a que sus brotes son difíciles de controlar.

Posee una resistencia intrínseca a varias familias de antibióticos y la capacidad de adquirir fácilmente mecanismos de resistencia a β -lactámicos de amplio espectro como cefalosporinas de tercera y cuarta generación, aminoglucósidos, fluoroquinolonas y tetraciclinas. Las resistencias intrínsecas incluyen penicilinas, aminopenicilinas, cefalosporinas de primera y segunda generación y cloranfenicol. Sus mecanismos de resistencia son mediados por casi todos los mecanismos conocidos en bacterias: modificación del sitio de unión, inactivación enzimática, eflujo y disminución de la entrada de la molécula [51] [52].

Respecto a la resistencia a β -lactámicos, las β -lactamasas son el mecanismo de resistencia principal identificado para este organismo, con alrededor de 50 enzimas identificadas. *A. baumannii* posee intrínsecamente una oxacilinasas de clase D, denominada OXA-51 y una cefalosporinasas tipo AmpC, ambas localizadas al interior del cromosoma. En la actualidad, se han llegado a describir 40 variantes de la oxacilinasas OXA-51 [53] [54]. En condiciones normales de expresión, estas enzimas logran hidrolizar débilmente penicilinas como la ampicilina o la piperacilina, y carbapenémicos como el imipenem y el meropenem, pero no tienen actividad contra cefalosporinas de espectro extendido [55]. Aun así, pueden llegar a producir fenotipos resistentes mediante la sobreexpresión genética, debido a la inclusión de secuencias de inserción que crean promotores transcripcionales fuertes [56].

En *A. baumannii*, la resistencia a carbapenémicos también está mediada por oxacilinasas, codificadas por las familias de genes *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-27}, *bla*_{OXA-37}, *bla*_{OXA-40} y *bla*_{OXA-58}, por metalo- β -lactamasas tipo VIM (*Verona integron-encoded metallo- β -lactamase*) y IMP (Imipenemasas), codificadas por los genes *bla*_{IMP-1}, *bla*_{IMP-2}, *bla*_{IMP-4}, *bla*_{IMP-5}, *bla*_{IMP-6} y *bla*_{IMP-11}; y *bla*_{VIM-2}, respectivamente [57]. La presencia de este

conjunto de enzimas le confiere resistencia a todos los antibióticos β -lactámicos. La resistencia a cefalosporinas de tercera generación en *A. baumannii* está mediada por la adquisición de BLEE de clase A, que incluyen los tipo TEM, SHV, CTX-M, GES (*Guiana-Extended-Spectrum*), SCO-1 (*S. Corvec*), PER (*Pseudomonas extended resistant*) y VEB (*Vietnam extended-spectrum β -lactamase*) [58] [59].

Se han reportado al menos tres mecanismos de resistencia a aminoglucósidos en *A. baumannii*, siendo el más importante la modificación del antibiótico producida por nueve enzimas modificadoras diferentes, codificadas por los genes *aac(3)-Ia*, *aac(3)-IIa*, *aac(6')-Ib*, *aac(6')-Ih*, *aph(3')-Ia*, *aph(3')-VI*, *ant(2'')-Ia* y *ant(3'')-Ia* [60] [61]. Estos genes se hallan frecuentemente en plásmidos, transposones o integrones.

La resistencia a quinolonas y fluoroquinolonas en *A. baumannii* es originada principalmente por mutaciones de los genes *gyrA* y *parC*, que codifican para las enzimas DNA girasa A y topoisomerasa IV, respectivamente. Finalmente, la resistencia a tetraciclinas está mediada por bombas de eflujo, TetA y TetB o proteínas de protección ribosomal TetM [59].

2.4. ANTIMICROBIANOS

El concepto del uso de sustancias químicas para el alivio de las enfermedades, particularmente las enfermedades infecciosas, se remonta al antiguo Egipto, Babilonia e inclusive la cultura Inca. Estos ejemplos de remedios antiguos incluyen la aplicación de mohos en cortes y heridas, y el consumo de rábanos, puerros, ajo y cebollas, hoy reconocidos por sus propiedades antimicrobianas [62].

La posibilidad que tiene un organismo de interferir con el crecimiento de otro ha sido sujeto de investigación intensa desde los inicios de la microbiología. En 1871, Sir John Burdon-Sanderson observó que un caldo nutritivo rápidamente se volvía turbio al estar en contacto con el aire, debido a las bacterias, pero si empezaba a crecer un hongo *Penicillium* en la superficie del medio, no ocurrían tantos cambios en él [62]. Así mismo, otros autores como William Roberts, John Tyndall y Joseph Lister, reportaron observaciones similares con *Penicillium* [63]–[65]. Una de las primeras referencias del potencial terapéutico de la inhibición del crecimiento bacteriano por otros organismos fue descrita por Pasteur y Joubert, mediante la inhibición del ántrax por los organismos del aire [62].

A pesar de que se observaron un gran número de antagonismos microbianos, el concepto de que la causa se debía a un compuesto producido por un organismo que mataba o inhibía al otro no se desarrolló inmediatamente. No fue sino hasta los trabajos de Corneil y Babes, sustentados en los experimentos de Garre, que se estableció que

el antagonismo microbiano se debía a la acción de una sustancia difusible producida por alguno de los organismos [62]. Para finales del siglo XIX, este fenómeno no solo era aceptado, sino que también se le dio un nombre: antibiosis. Es de este modo, mediante el estudio de antagonismos microbianos, principalmente entre hongos y bacterias, que se llega a la implementación de la primera sustancia antimicrobiana conocida por el hombre, la penicilina. Existen cinco modos principales de mecanismos de acción para los antimicrobianos. En la tabla 2 se muestran algunos ejemplos de estos mecanismos.

Tabla 2. Mecanismos de acción de los antimicrobianos y ejemplos de cada tipo.

Mecanismo de acción	Antimicrobiano
Interferencia de la síntesis de pared celular	β -lactámicos, glucopéptidos
Inhibición de la síntesis de proteínas	Oxazolidinonas, tetraciclinas, macrólidos, aminoglucósidos
Interferencia de la síntesis de ácidos nucleicos	Rifampicina, quinolonas
Inhibición de rutas metabólicas	Sulfonamidas, trimetoprim
Desorganización de la membrana celular	Polimixinas, lipopéptidos

2.5. MECANISMOS DE RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS

La resistencia a los antimicrobianos se produce cuando los microorganismos, sean bacterias, virus, hongos o parásitos, sufren cambios que hacen que los antimicrobianos usados para curar las infecciones dejen de ser eficaces. Este es un fenómeno muy preocupante porque las infecciones provocadas por microorganismos resistentes pueden causar la muerte del paciente, transmitirse a otras personas y generar grandes costos tanto para los pacientes como para la sociedad [6].

La resistencia a los antimicrobianos es un problema de salud pública provocado por una gran cantidad de factores entre los que se destaca el uso indiscriminado de estas moléculas. Aunque es difícil el cálculo cuantitativo del impacto total de la resistencia a antimicrobianos en la salud, sí se puede inferir que la morbilidad y la mortalidad presentan un aumento cuando hay retrasos en la administración de tratamientos eficaces contra las infecciones causadas por patógenos resistentes [6]. Además, los tiempos de hospitalización, la administración de procedimientos y medicamentos, conllevan al aumento en términos económicos para el sistema de salud y para el paciente por la pérdida de productividad.

Debido al aumento de la transmisión de enfermedades infecciosas entre la población y a través de fronteras geográficas y la importancia para las generaciones futuras, la resistencia a los antimicrobianos ha sido catalogada como un problema de salud pública a nivel mundial [66].

Adicionalmente, la resistencia a los antimicrobianos en bacterias Gram negativas, es un problema en continuo aumento tanto dentro como fuera de las instituciones hospitalarias. La proporción de resistencia en *Enterobacteriaceae* a cefalosporinas de tercera generación ha venido en aumento desde la década de los 80, principalmente en *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*. La proporción de multidrogo resistencia (*multidrug resistant* - MDR) en *Pseudomonas aeruginosa* se ha multiplicado más de tres veces desde 1993 y la proporción de especies de *Acinetobacter* resistentes a carbapenemasas ha pasado de cero en 1986 hasta más del 20% en la última década [6].

2.5.1. INACTIVACIÓN DEL ANTIMICROBIANO

2.5.1.1. HIDRÓLISIS

Muchos antimicrobianos poseen enlaces químicos, como las amidas y los ésteres, susceptibles a la hidrólisis. Muchas enzimas son conocidas por disminuir o eliminar la actividad enzimática al hacer blanco y romper dichos enlaces. Estas enzimas por lo general pueden ser excretadas. Las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) median la resistencia a todas las penicilinas, cefalosporinas de tercera generación y al aztreonam, pero no a los carbapenémicos [67].

2.5.1.2. PROCESOS REDOX

Las bacterias patógenas no suelen explotar la oxidación o reducción de los antimicrobianos. Sin embargo, existen unos cuantos ejemplos de esta estrategia [68], [69]. El primero es la oxidación de la tetraciclina por la enzima TetX. Otro ejemplo es *Streptomyces virginiae*, un productor del antimicrobiano estreptogramina tipo A virginiamicina M1, el cual se protege a sí mismo de su propio antimicrobiano reduciendo un grupo cetona crítico a un alcohol en la posición 16.

2.5.1.3. INACTIVACIÓN DEL ANTIMICROBIANO POR TRANSFERENCIA DE GRUPOS

La familia más común de enzimas de resistencia son las transferasas. Estas enzimas inactivan los antimicrobianos (aminoglucósidos, cloranfenicol, estreptogramina, macrólidos o rifampicina) por sustituciones químicas (adición de grupos adenilil, fosforil o acetil a la periferia de la molécula del antimicrobiano). Los antimicrobianos modificados poseen una capacidad deteriorada de unión a su molécula objetivo. Entre estas estrategias químicas se encuentran O-acetilaciones y N-acetilaciones [70], [71], O-fosforilaciones [72], O-nucleotidilaciones [73], O-ribosilaciones, O-glicosilaciones y tiol transferencias. Todas estas modificaciones requieren como cosustrato ATP, acetil-CoA,

NAD⁺, UDP-glucosa o glutatión para su actividad y por ello estos procesos solo se llevan a cabo en el citoplasma.

2.5.1.4. RESISTENCIA ANTIMICROBIANA VÍA MODIFICACIÓN DEL BLANCO

Después de la inactivación del antimicrobiano, la modificación del sitio de acción del antimicrobiano es el segundo mayor mecanismo de resistencia, así este es incapaz de unirse correctamente. Aun así, es posible que mediante mutaciones ocurra un cambio en la molécula objetivo que reduzca la susceptibilidad de inhibición mientras se mantiene la función celular [74].

2.5.2. GENÉTICA DE LA RESISTENCIA ANTIMICROBIANA

2.5.2.1. RESISTENCIA VÍA MUTACIONES

Existe un sustancial número de mecanismos bioquímicos de resistencia antimicrobiana basados en eventos mutagénicos, como lo son las mutaciones de las secuencias de genes que codifican el blanco de ciertos antimicrobianos (por ejemplo la resistencia a la rifampicina y a las fluoroquinolonas es causada por la mutación en los genes blanco de esas moléculas, RpoB y ADN-topoisomerasas, respectivamente) [75]. Las variaciones en la expresión del consumo de antimicrobianos o los sistemas de eflujo también pueden ser modificados por mutaciones (por ejemplo la expresión reducida o la completa ausencia de la porina OprD de *Pseudomonas aeruginosa* reduce la permeabilidad de la pared celular a carbapenémicos) [76].

2.5.3. RESISTENCIA ANTIMICROBIANA VÍA TRANSFERENCIA HORIZONTAL DE GENES

Uno de los principales mecanismos mediante los cuales se ha expandido la resistencia antimicrobiana es la transferencia horizontal de material genético. La resistencia puede ser transferida por mecanismos directos como la conjugación, la transformación o la transducción. En los últimos 15 años, las enzimas β -lactamasas que tienen un espectro extendido de actividad (BLEE) contra la mayoría de β -lactámicos, incluyendo cefalosporinas pero no carbapenémicos, han evolucionado. Una de estas es la CTX-M-15, encontrada inicialmente en *E. coli* pero ahora se puede hallar en otros miembros de las *Enterobacteriaceae* y se asocia comúnmente con un linaje específico, el clon uropatogénico ST131 [77], [78] que se ha expandido a nivel mundial.

2.6. PRINCIPALES ANTIMICROBIANOS EMPLEADOS CONTRA LAS IAAS

2.6.1. β -LACTÁMICOS

Los antibióticos β -lactámicos han sido la piedra angular de la salud humana por cerca de siete décadas. Su preeminencia en el tratamiento de infecciones bacterianas es el resultado de su eficacia clínica sin paralelo y su seguridad. Sin embargo, la historia de los β -lactámicos no es estática. Es decir, el relativamente corto periodo de la historia humana durante el cual han demostrado sus beneficios, es un periodo caracterizado por innovaciones continuas, más visibles en cuanto a la evolución estructural de las subclases de β -lactámicos, llevados para combatir la habilidad bacteriana de innovación en cuanto a mecanismos de resistencia [79].

Desde el inicio de su uso en la década de 1940, los β -lactámicos son los antimicrobianos más prescritos, tanto en atención primaria como en los hospitales. Aunque no se conoce ningún β -lactámico nuevo desde hace más de dos décadas la aparición de resistencias y el mejor entendimiento de sus mecanismos moleculares ha hecho que aumente el interés en su estudio [80].

Esta familia de antibióticos fue definida químicamente en 1945 por la presencia de un anillo β -lactámico o 2-azetidiona [79], originando diversos grupos de antibióticos, como son las penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, monobactámicos e inhibidores de las β -lactamasas. Las penicilinas son antibióticos que poseen un anillo β -lactámico y un anillo de tiazolidina, lo que forma el ácido 6-aminopenicilánico. Además poseen una cadena lateral, que varía de unas penicilinas a otras. La modificación en las cadenas laterales origina diversas cefalosporinas (ceftriaxona, cefepime). Los carbapenémicos consisten en un anillo β -lactámico fusionado a uno pirrolidínico compartiendo un nitrógeno (meropenem, ertapenem).

2.6.1.1. MECANISMO DE ACCIÓN

El interés por el mecanismo de acción de los β -lactámicos se desarrolló rápidamente justo después de la introducción de la penicilina. La investigación del modo de acción de los antimicrobianos β -lactámicos ha progresado a través de diversas rutas de manera independiente [62]. Estas rutas incluyen el análisis fisiológico de los efectos de los β -lactámicos en el crecimiento, viabilidad, forma, división e integridad de las bacterias; al análisis bioquímico de la estructura de la pared celular y las enzimas involucradas en su biosíntesis; el análisis biofísico de los componentes celulares que se unen fuertemente a las penicilinas y los intentos para relacionar esta unión con los efectos fisiológicos; y el análisis genético de mutantes con una respuesta alterada.

La eficacia de los β -lactámicos radica en que hacen objetivo una actividad enzimática esencial para la viabilidad celular, mientras que la eficiencia se debe a la singularidad de esta ruta enzimática en las bacterias: la síntesis de peptidoglicano [79]. Claramente, el entendimiento de la relación entre el reconocimiento del antimicrobiano por la enzima y la reactividad de éste hacia la enzima, es el centro de la comprensión de la actividad antimicrobiana de los β -lactámicos. A continuación se da una perspectiva para el entendimiento mecanístico de este fenómeno.

Las bacterias son organismos unicelulares y al igual que las células eucariotas poseen una membrana lipídica. En contraste con las células eucariotas, pero reflejando la necesidad de las bacterias de una estabilidad mecánica y osmótica, las membranas bacterianas se encuentran integradas con una capa delgada polimérica que rodea la célula. Esta capa polimérica está compuesta por una glucidos y aminoácidos, en lo que se ha descrito como peptidoglicano, debido a que en un principio se creía que la proporción entre glucidos y aminoácidos era la misma [62]. Al peptidoglicano que constituye la envoltura celular bacteriana se le denomina mureína. Con el pasar del tiempo, ambos términos se volvieron intercambiables y se usan actualmente sin distinción.

El peptidoglicano se forma de largas cadenas de glucidos, formadas por la repetición de ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina. El ácido murámico fija cadenas de tetrapéptidos que se unen entre sí. Los β -lactámicos inhiben dicha unión (transpeptidación), lo que debilita la pared celular y esta puede romperse por la presión osmótica de la misma célula bacteriana. Para que actúen, la bacteria debe encontrarse en proceso de crecimiento, ya que es cuando se sintetiza la pared celular. Los β -lactámicos también actúan activando una autolisina bacteriana endógena que destruye el peptidoglicano [80].

Los blancos moleculares de los antimicrobianos β -lactámicos son las enzimas involucradas en la biosíntesis, mantenimiento estructural y la unión (después de la separación en la división celular) de la pared celular. Por razones históricas, estas enzimas se denominaron proteínas de unión a penicilina, o por sus siglas en inglés PBP's (*Penicillin Binding Proteins*), una nomenclatura que se conserva en la actualidad [81]. El término "unión" implica que más allá de un reconocimiento hay una unión de carácter covalente. Posteriormente al reconocimiento del β -lactámico por parte de la PBP una serina de la PBP se une al grupo carbonilo del anillo para abrirlo en una reacción irreversible de acilación de serina. El producto de esta reacción es catalíticamente inactivo. Por lo general estas enzimas son bifuncionales, es decir, poseen dos sitios activos diferentes en un solo polipéptido. Las PBP's poseen cuatro dominios estructurales [82], [83] a estas se les denomina de alto peso molecular de

clase A y B. El primer dominio es una secuencia polipeptídica anfipática que colocaliza la enzima en el exterior de la membrana citosólica mediante la asociación con el pivote biosintético estructural denominado Lípido II. El segundo dominio tiene una actividad catalítica de glicosiltransferasa. El tercer dominio de la PBP es de nuevo estructural, cuya principal función es actuar como separador entre el segundo dominio (el dominio catalítico glicosiltransferasa) del cuarto y último dominio. Este último dominio, también catalítico, con actividad transpeptidasa es el objetivo de los antimicrobianos β -lactámicos. La destrucción de la pared celular se logra a partir de la inhibición de la última etapa de la síntesis de peptidoglicano, es decir, en unión del peptidoglicano recién formado a la capa ya existente por transpeptidación [80].

Existen además en todas las bacterias una o más PBPs de bajo peso molecular [84], [85]. Estas enzimas poseen tres dominios: el extremo anfipático cuya función es la asociación con el Lípido II, conectado a un segundo dominio estructural y finalmente un tercer dominio con actividad catalítica en el espacio periplasmático, presumiblemente en contacto con la membrana plasmática. El rol individual de las enzimas no está bien definido aún. También, esta colectividad enzimática está íntimamente involucrada en el control de la forma de la célula [86], [87] y la separación de las células hijas en la reproducción celular, aunque no son esencialmente críticas para la supervivencia. Un ejemplo de esto ocurre en *E. coli*, donde la pérdida de la actividad de la PBP 5 por delección génica resulta en una *E. coli* viable con morfología aberrante, mientras que su sobreexpresión es letal [88], [89]. Dependiendo de la estructura química del antimicrobiano β -lactámico, tanto el dominio transpeptidasa como el dominio carboxipeptidasa de las PBPs pueden ser inactivados por la acilación de la serina. Desde el punto de vista del diseño de fármacos, un β -lactámico que posea acción diferencial entre estas dos clases es altamente deseable [90]. La inactivación de las transpeptidasas es bactericida pero la coinactivación de las carboxipeptidasas es un evento clave, empleado esto por las bacterias Gram negativas para identificar la presencia de β -lactámicos permitiendo la activación de mecanismos de resistencia, mediada principalmente por la expresión de β -lactamasas [91], [92]. Las β -lactamasas son enzimas hidrolíticas, extremadamente eficientes, que reconocen selectivamente a los β -lactámicos y desactivan el anillo por apertura del aminoácido β . La expresión de β -lactamasas es un mecanismo clave para la resistencia a β -lactámicos en bacterias Gram negativas.

2.6.1.2. MECANISMOS DE RESISTENCIA A β -LACTÁMICOS

El uso terapéutico de un antimicrobiano eventualmente lleva a la presencia de resistencia hacia este. No es necesario para el microorganismo identificar un solo mecanismo de resistencia, ni tampoco es necesario que un mecanismo de resistencia

resulte en la completa evasión del antimicrobiano. En cambio, la aparición de resistencia en un microorganismo coincide con la adquisición de un mecanismo de resistencia decisivo, incitado por la selección adicional de mecanismos de resistencia secundarios [79]. Aunque se conoce la base molecular de los mecanismos de resistencia empleados contra los β -lactámicos, en muchos casos detalles importantes de cómo el mecanismo es implementado por la bacteria son desconocidos [93], [94]. La combinación de estos mecanismos aumenta la concentración de antimicrobiano necesaria para lograr un efecto bactericida a un nivel mayor al que se puede alcanzar por quimioterapia. Para los microorganismos Gram positivos, el hecho decisivo es el uso de enzimas PBP adquiridas con pobre reconocimiento hacia los β -lactámicos, o remodelar la biosíntesis del peptidoglicano para obviar la transpeptidación. Para los microorganismos Gram negativos, se ve la adquisición de β -lactamasas, incrementando la habilidad de destruir antimicrobianos β -lactámicos, inclusive de generaciones avanzadas. Para ambos tipos de microorganismos los mecanismos de resistencia secundarios son la selección de porinas (proteínas que controlan la entrada y salida de solutos en la bacteria) con una reducida habilidad de transportar β -lactámicos dentro de la célula, y el uso de transportadores activos para facilitar el egreso del antimicrobiano [79].

2.6.1.3. β -LACTAMASAS

Como los β -lactámicos fueron los primeros antimicrobianos, la resistencia a estos fue la primera en ser entendida. La forma más común de las bacterias de contrarrestar estas sustancias ha sido la producción de β -lactamasas, enzimas que inactivan los medicamentos por hidrólisis del anillo β -lactámico [62]. A las primeras β -lactamasas, aisladas en los años 60 producto de la presión selectiva ejercida por la introducción de la ampicilina, carbenicilina y las primeras cefalosporinas, se les denominó β -lactamasas de amplio espectro (BLEA), donde se encuentran TEM-1, TEM-2 y SHV-1; posteriormente se confirmó que ofrecían resistencia a ampicilina y amoxicilina pero no a cefalosporinas de tercera generación [21], [95]. En 1983 se detectaron en Alemania los primeros aislamientos de *K. pneumoniae* y *E. coli* resistentes a cefalosporinas de tercera generación. Posteriormente, se demostró que la resistencia era debida a la producción de una β -lactamasa transferible mediante plásmidos. A estas nuevas β -lactamasas se les denominaron de espectro extendido (BLEE), ya que podían hidrolizar un gran número de antibióticos β -lactámicos, incluyendo aquellos con el grupo oximino, como las cefalosporinas de tercera y cuarta generación, así como al aztreonam [21], [96]. Estas enzimas son derivadas de mutaciones en los genes que codifican las BLAE, lo que originó cambios en la secuencia proteica [95]. La aparición de nuevas bacterias productoras de BLEE tiene repercusiones muy importantes debido a su posible

transferencia mediante plásmidos, a ser causantes de brotes e IAAS, aumentan la morbilidad y limitan las opciones terapéuticas [97].

Según análisis de secuencia, se cree que las β -lactamasas y las PBPs divergen a partir de un ancestro en común. Se plantea que estas enzimas, tal vez, originalmente cumplieron alguna función en los procesos de síntesis de la pared bacteriana. Todas las PBPs poseen la capacidad catalítica de las β -lactamasas en una menor medida. Al momento de la última actualización de β -lactamasas realizada por Bush and Jacoby en el año 2010, se describieron alrededor de 900 moléculas únicas con características de penicilinasas, cefalosporinasas y/o carbapenemasas [22], [98]. Debido a la diversidad de las características enzimáticas de muchas β -lactamasas descubiertas, se han hecho muchos intentos por categorizarlas desde 1960 [20], [22], [99]. Estas clasificaciones involucran dos enfoques importantes: el primero, y más antiguo, se basa en las características bioquímicas y funcionales de la enzima, mientras que el segundo enfoque se basa en la estructura molecular. En el antiguo sistema de clasificación se empleaban varios criterios, incluyendo el perfil del sustrato antimicrobiano, el perfil de inhibición enzimático, el rango de hidrólisis (V_{max}), la afinidad de unión (K_m), punto isoeléctrico (pI), peso molecular y composición aminoacídica. La clasificación molecular de las β -lactamasas está basada en las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de esas enzimas. A la fecha, se reconocen cuatro clases (A – D), correlacionadas con la clasificación funcional. Las clases A, C y D actúan por un mecanismo basado en serina, mientras que la clase B o metalo- β -lactamasas necesitan zinc para su acción. La localización del gen que codifica la β -lactamasa es muy variable, pudiendo localizarse tanto en el cromosoma como en plásmidos. La clasificación de Bush consta de 3 grupos y varios subgrupos; se basa en la funcionalidad, teniendo en cuenta criterios como las propiedades fisicoquímicas, peso molecular, espectro de hidrólisis y la capacidad de inhibición [22].

2.6.1.3.1. Clase de Ambler A

Fue descrita inicialmente en plásmidos de Gram positivos. Aun así, las β -lactamasas mediadas por plásmidos, transposones y por el cromosoma (VHS, PER, TEM y SHV) también han sido reportadas en bacterias Gram negativas [100]. Esta clase de enzimas, apodadas penicilinasas, exhiben el mayor grado de variabilidad de secuencias y propiedades cinéticas. Las β -lactamasas clase A identificadas en *P. aeruginosa* son activas contra las carbenicilinas (CARB) se denominan β -lactamasas específicas de *Pseudomonas* (PSE).

Tabla 3. Clasificación de las β -lactamasas [22].

Ambler (1980)	Bush-Jacoby (2010)	Sustrato	Inhibidor		Representante
			Á. clavulánico	EDTA	
A	2a	Penicilinas	Sí	No	PC-1
	2b	Penicilinas y cefalosporinas 1° generación	Sí	No	TEM-1, TEM-2, SHV-1
	2be	Cefalosporinas EE y monobactámicos	Sí	No	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15
	2br	Penicilinas	No	No	TEM-30, SHV-10
	2ber	Cefalosporinas EE y monobactámicos	No	No	TEM-50
	2c	Carbenicilinas	Sí	No	PSE-1, CARB-3
	2ce	Carbenicilinas y cefepime	Sí	No	RTG-4
	2e	Cefalosporinas EE	Sí	No	CepA
	2f	Carbapenémicos	Variable	No	KPC, IMI, SME
B	3a	Carbapenémicos	No	Sí	IMP, VIM, GIM, SPM, SIM
	3b	Carbapenémicos	No	Sí	CAU, GOB, FEZ
C	1	Cefalosporinas y cefamicinas	No	No	AmpC, CMY-2, FOX, MIR, ACT
D	2d	Cloxacilina	Variable	No	OXA-1, OXA-10
	2de	Cefalosporinas de EE	Variable	No	OXA-11, OXA-15
	2df	Carbapenémicos	Variable	No	OXA-23, OXA-24, OXA-48

2.6.1.3.2. Clase de Ambler B

Estas enzimas contienen un pequeño número de metalo- β -lactamasas dependientes de Zn^{+2} , por lo que su actividad puede ser inhibida por EDTA [101]. IMP-1 es la primera metalo- β -lactamasa descrita en *P. aeruginosa*, su gen, *bla_{IMP}*, parece estar diseminado en cepas de *P. aeruginosa* alrededor del mundo. Otra metalo- β -lactamasa, codificada por el gen *bla_{VIM}* que se encuentra en un integrón, fue descrita por primera vez en *P. aeruginosa* en Italia y otorga resistencia a meropenem e imipenem.

2.6.1.3.3. Clase de Ambler C

Estas son activas contra cefalosporinas y son comúnmente cefalosporinasas. Estas son codificadas en el cromosoma y hacen parte de la gran mayoría de bacterias Gram negativas, también se conoce que las secuencias de estas enzimas son altamente conservadas [62].

2.6.1.3.4. Clase de Ambler D

Estas son llamadas oxacilinasas debido a su capacidad de degradar los isoxazolil- β -lactámicos como lo son la oxacilina y la meticilina, a su vez que el ácido clavulánico funciona como buen inhibidor en estas enzimas. A pesar de la similitud entre las β -

lactamasas de clase A y D, se ha sugerido el uso de 26 residuos de aminoácidos conservados como el esquema de numeración estándar para la clase D.

2.6.1.4. PRINCIPALES β -LACTAMASAS

Como se dijo anteriormente, las β -lactamasas en las bacterias Gram negativas inactivan las penicilinas y cefalosporinas por hidrólisis y son la causa predominante de resistencia a estos antimicrobianos. Dentro de las enzimas de clase A se encuentran las enzimas de amplio espectro y codificadas por plásmidos de las familias *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{CTX-M}, las cuales son las enzimas que se encuentran con mayor frecuencia. Debido al uso excesivo de estos antimicrobianos, las enzimas *bla*_{TEM}, encontradas originalmente en *Enterobacteriaceae*, ahora pueden ser también encontradas en *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* y en *Neisseria gonorrhoeae* [67], [102]. De forma similar, enzimas de la familia *bla*_{SHV} han sido encontradas en *Klebsiella*, *Escherichia*, *Salmonella* e inclusive en *Pseudomonas*.

Las nuevas cefalosporinas, diseñadas para resistir la acción hidrolítica de las β -lactamasas, están siendo usadas ampliamente como tratamiento contra las infecciones serias de bacterias Gram negativas. Esto ha conducido a la selección de mutantes con alteraciones en la secuencia de aminoácidos alrededor del sitio activo de la enzima, haciendo un espectro más amplio de antimicrobianos β -lactámicos susceptibles a la hidrólisis por esas enzimas. Por esto, las BLEE se derivan de sustituciones de aminoácidos en las familias de enzimas *bla*_{TEM} y *bla*_{SEM}. Las BLEE forman un clúster molecular heterogéneo con una distribución a nivel mundial [67], [102].

Por su parte, las enzimas *bla*_{CTX-M}, codificadas por plásmidos, hidrolizan preferiblemente cefotaxime en las *Enterobacteriaceae*. Estas enzimas comparten alrededor del 40% de los aminoácidos con las enzimas *bla*_{SHV} y *bla*_{TEM}.

2.6.1.4.1. TEM (Temoniera)

TEM-1 es la β -lactamasa más común en bacterias Gram negativas. Hasta el 90% de la resistencia a ampicilina en *E. coli* se debe a TEM-1. Esta enzima también es la responsable del aumento de la resistencia a β lactámicos en *Haemophilus influenzae* y en *Neisseria gonorrhoeae*. Esta enzima es capaz de hidrolizar cefalosporinas de primeras generaciones como cefalotina y cefaloridina [102]. TEM-2, la primera variación de TEM-1, tiene una sola sustitución de un aminoácido de la enzima original [103]. Esto causa un cambio en el punto isoeléctrico de 5,4 a 5,6 sin cambiar el perfil del sustrato. TEM-3 se reportó originalmente en 1989, fue la primera β -lactamasa tipo TEM que mostró el fenotipo de una BLEE [104]. Desde entonces, más de 90 derivados de TEM

adicionales han sido descritos (<https://www.lahey.org/Studies/>), siendo la mayoría de ellas BLEE.

Como se muestra en la figura 1, la sustitución de los aminoácidos ocurre en un número limitado de posiciones. La combinación de estos cambios resulta en alteraciones sutiles de los fenotipos de las BLEE, como la habilidad de hidrolizar antimicrobianos específicos como la ceftazidima y el cefotaxime, o cambios en sus puntos isoeléctricos entre 5,2 y 6,5. Existe un número de residuos de aminoácidos que son especialmente importantes en la producción de nuevas BLEE cuando ocurren las sustituciones en sus posiciones. Esto incluye glutamato a lisina en la posición 104, arginina a serina o histidina en la posición 164, glicina a serina en la posición 238 y glutamato a lisina en la posición 240. Además de las β -lactamasas TEM-1 a TEM-92 que se muestran en la figura, se han reportado enzimas similares a TEM de forma natural, TEM-AQ, que contienen un número de sustituciones en aminoácidos y una delección de un aminoácido que no se observan en otras enzimas TEM [105].

Se ha sugerido que la aparición natural de BLEE tipo TEM es el resultado de la fluctuación en la presión selectiva de varios β -lactámicos dentro de una institución dada, en lugar de una selección mediada por un único agente [106]. A pesar de que las β -lactamasas tipo TEM son las más comunes en *E. coli* y *K. pneumoniae*, también pueden ser encontradas en otras especies de bacterias Gram negativas cada vez con mayor frecuencia. Se han reportado BLEE tipo TEM en la familia *Enterobacteriaceae*, como *Enterobacter aerogenes*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus rettgeri* y *Salmonella* spp [102]. Además, se han encontrado BLEE tipo TEM en bacterias que no pertenecen a las *Enterobacteriaceae*, como TEM-42 que fue encontrada en *P. aeruginosa* [107] o TEM-17, encontrada en un aislamiento de *Capnocytophaga ochracea* [72], [108].

2.6.1.4.2. B-LACTAMASAS RESISTENTES A LOS INHIBIDORES

Aunque las β -lactamasas resistentes a los inhibidores no son BLEE, a menudo se tratan en el mismo grupo debido a que también son derivadas de las enzimas clásicas tipo TEM o SHV. Se han reportado al menos 19 enzimas TEM resistentes a los inhibidores. Estas se han encontrado mayormente en aislamientos clínicos de *E. coli*, pero también en algunas cepas de *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *P. mirabilis* y *C. freundii* [109], [110]. Aunque las variantes de TEM resistentes a los inhibidores son también resistentes a la inhibición por ácido clavulánico y sulbactam, y por tanto mostrando resistencia clínica a combinaciones de amoxicilina-clavulanato, ticarciclina-clavulanato y ampicilina-sulbactam, en ocasiones son susceptibles a la inhibición por tazobactam y a combinaciones de piperacilina y tazobactam.

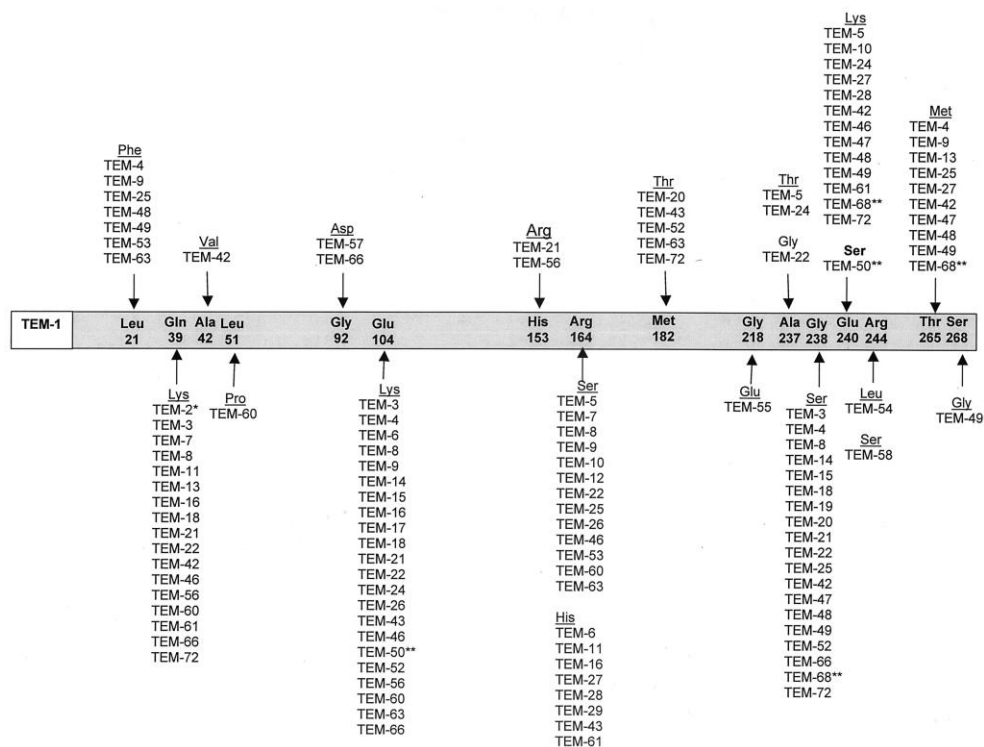


Figura 1. Sustituciones de los aminoácidos en BLEE derivadas de TEM. Los aminoácidos que se encuentran en la línea gris son los reportados originalmente en la proteína estructural de la β -lactamasa TEM-1. La numeración de los aminoácidos corresponde al esquema de Ambler. Las sustituciones encontradas en las BLEE tipo TEM se muestran debajo de los aminoácidos de TEM-1. Las variantes TEM pueden contener más de una sustitución. Solo se muestran las sustituciones que son comunes en las BLEE derivadas de TEM [102]. *, TEM-2 no es una BLEE pero se incluye como derivado de TEM-1. **, TEM-50 y TEM-68 contienen sustituciones de aminoácidos comunes en el fenotipo BLEE.

2.6.1.4.3. SHV (Sulfhidril Variable)

La familia de β -lactamasas SHV aparentemente deriva de *Klebsiella* spp. La enzima progenitora de la familia, la SHV-1, se encuentra universalmente en *K. pneumoniae*. En muchas cepas de *K. pneumoniae*, el gen que codifica SHV-1, reside en el cromosoma bacteriano. Puede ser que el gen para SHV-1 evolucionara como un gen cromosómico de *Klebsiella* y luego fuera incorporado en un plásmido, el cual se ha esparcido a las otras especies de *Enterobacteriaceae*. Esta β -lactamasa es responsable de hasta el 20% de la resistencia a ampicilina mediada por plásmidos [102].

A diferencia de las β -lactamasas tipo TEM, existen pocas variantes de SHV-1. Además, los cambios que dan origen a las variantes de SHV ocurren en unas cuantas posiciones dentro del gen estructural. La mayoría de estas variantes poseen un fenotipo de BLEE y se caracterizan por la sustitución de una serina por glicina en la posición 238 [102]. Un número de variantes relacionadas con la SHV-5 también poseen una sustitución de una lisina por un glutamato en la posición 240. Es interesante que tanto las sustituciones de los aminoácidos Gly238Ser y Glu240Lys también se observan en las BLEE tipo TEM.

La serina en la posición 238 es crítica para la hidrólisis eficiente del ceftazidime y el residuo de lisina es crítico en la hidrólisis de cefotaxime [111]. Aunque las β -lactamasas tipo SHV son mayormente encontradas en cepas de *K. pneumoniae*, actualmente pueden encontrarse en *Citrobacter diversus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*.

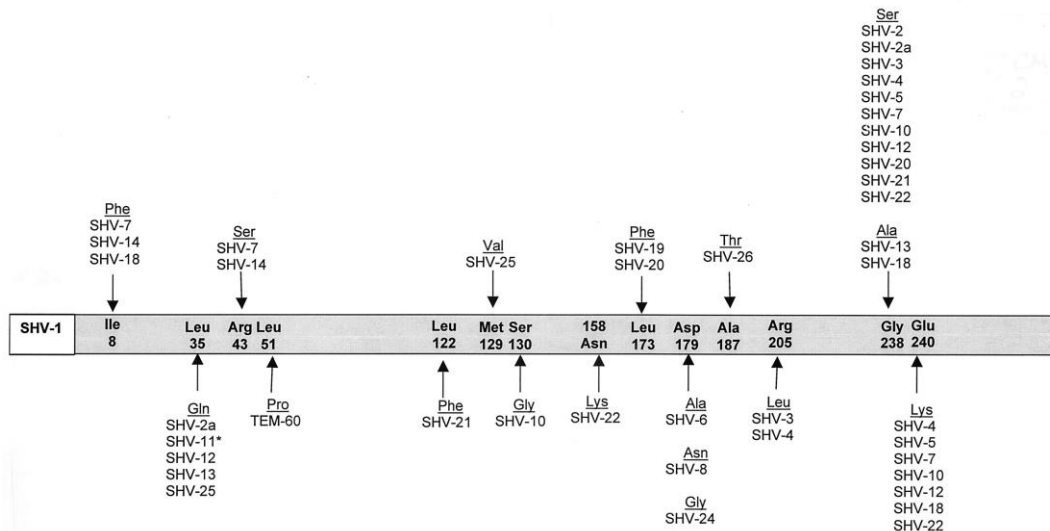


Figura 2. Sustituciones de los aminoácidos en BLEE derivadas de SHV. Los aminoácidos que se encuentran en la línea gris son los reportados originalmente en la proteína estructural de la β -lactamasa SHV-1. La numeración de los aminoácidos corresponde al esquema de Ambler. Las sustituciones encontradas en las BLEE tipo SHV se muestran debajo de los aminoácidos de SHV-1. Las variantes SHV pueden contener más de una sustitución [102].*, SHV-11 no es una BLEE pero se incluye como derivado de SHV-1.

2.6.1.4.4. CTX-M (Cefotaxima)

Las BLEE denominadas CTX-M, son un grupo de enzimas mediadas por plásmidos que hidrolizan, preferencialmente, cefotaxime. Se encuentran principalmente en cepas de *Salmonella enterica* y *E. coli*, pero también se han descrito en otras especies de *Enterobacteriaceae*. Estas enzimas no se encuentran muy relacionadas con las β -lactamasas TEM o SHV, las cuales entre ellas poseen aproximadamente un 40% de homología. Recientemente se reportó un alto grado de homología entre la enzima cromosómica AmpC de *Kluyvera ascorbata* y las enzimas CTX-M, lo que sugiere que el posible origen fue en esta especie. Un estudio filogenético de la familia de β -lactamasas CTX-M mostró 4 tipos principales: CTX-M-1, incluyendo CTX-M-1 y CTX-M-3; CTX-M-2, incluyendo CTX-M-2, CTX-M-4, CTX-M-5, CTX-M-6, CTX-M-7 y Toho-1; Toho-2; y CTX-M-8 [112]. Las distancias evolutivas entre cada uno de estos grupos sugieren una divergencia temprana a partir de un ancestro común.

Estudios cinéticos han mostrado que las β -lactamasas hidrolizan cefalotina o cefaloridina mejor que a las bencilpenicilinas y estas hidrolizan principalmente cefotaxime sobre ceftazidime. A pesar de que hay algo de hidrólisis de ceftazidime por estas enzimas, usualmente no es suficiente para proveer resistencia clínica a los

organismos que poseen la enzima. Se ha sugerido que el residuo de serina en la posición 237, que se encuentra en todas las enzimas CTX-M, juega un papel importante en el espectro extendido de estas β -lactamasas [113]. Se han aislado bacterias que expresan β -lactamasas tipo CTX-M alrededor de todo el mundo, pero han sido asociadas a brotes en Europa, Sur América y Japón [114].

2.6.2. CARBAPENÉMICOS

Dentro de los β -lactámicos disponibles, los carbapenémicos son únicos debido a que son relativamente resistentes a la hidrólisis de la mayoría de las β -lactamasas, en algunos casos actúan como “sustratos lentos” e inclusive como inhibidores de las β -lactamasas y aún hacen objetivo a las PBPs. Este “valor agregado” de inhibición de las β -lactamasas es la mayor razón por la cual esta clase de β -lactámicos se encuentra en expansión [115].

Los carbapenémicos juegan un papel crítico en el armamento antimicrobiano actual. De los cientos de tipos de β -lactámicos, los carbapenémicos poseen el mayor espectro de actividad y la mayor potencia contra bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas. Como resultado de esto, por lo general los carbapenémicos se utilizan como última línea de tratamiento cuando los pacientes con infecciones se agravan [116]. Desafortunadamente, la reciente aparición de patógenos multirresistentes ha amenazado el uso de estos antimicrobianos [117]. Numerosos estudios recientes, muestran claramente que la resistencia a los carbapenémicos ha ido en aumento en todo el mundo [118]–[123]. A pesar de esta tendencia amenazante, se está experimentando un renacimiento en el mejoramiento y uso de estos antimicrobianos.

A finales de la década de 1960, el surgimiento de las β -lactamasas amenazó el uso de la penicilina como antimicrobiano y empezó la búsqueda de inhibidores de las β -lactamasas [124], [125]. Para 1976, se descubrió el primer inhibidor de β -lactamasas, los ácidos olivánicos, productos naturales producidos por la bacteria Gram negativa *Streptomyces clavuligerus*. El ácido olivánico posee un “esqueleto carbapenémico” y actúa como un β -lactámico de amplio espectro [125]. Debido a la inestabilidad química y la pobre penetración a la bacteria, los ácidos olivánicos no siguieron siendo investigados [115], [126]. Luego de esto, se descubrieron 2 inhibidores de las β -lactamasas (i) el ácido clavulánico de *S. clavuligerus*, el primer inhibidor de las β -lactamasas disponible clínicamente [127], y (ii) la tienamicina de *Streptomyces catleya*. La tienamicina fue el primer “carbapenémico” y fue el compuesto principal usado como modelo para todos los carbapenémicos.

El término “carbapenémicos” se define como el anillo lactámico 4:5 fusionado de las penicilinas con un doble enlace entre el C-2 y C3 pero con una sustitución del carbono por un azufre en el C-1. Sorprendentemente, la tienamicina demostró tener una potente actividad como antimicrobiano de amplio espectro y como inhibidor de las actividades de las β -lactamasas [115]. A pesar de que la tienamicina es un “producto natural” y su ruta biosintética fue determinada, los rendimientos de los procesos de purificación

fueron muy bajos [122]. Con el tiempo, la síntesis de tienamicina asumió mayor importancia, especialmente con el descubrimiento del imipenem.

2.6.2.1. MECANISMOS DE RESISTENCIA CONTRA CARBAPENÉMICOS

Muchas bacterias Gram negativas no fermentadoras (*Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. y *Stenotrophomonas* spp.) como también la familia *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella* spp., *E. coli* y *Enterobacter* spp.) y bacterias Gram positivas (*Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp. y *Nocardia* spp.) son o están obteniendo resistencia a la mayoría de carbapenémicos clínicamente disponibles. Este patrón angustiante plantea una importante amenaza para la salud pública.

Los mecanismos de resistencia a los carbapenémicos incluyen la producción de β -lactamasas, bombas de eflujo y mutaciones que alteran la expresión y/o función de las porinas y las PBPs [115]. Las combinaciones entre estos mecanismos pueden causar altos niveles de resistencia a los carbapenémicos en ciertas especies bacterianas como *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *A. baumannii* [125], [128], [129].

Existe una diferencia en la resistencia a carbapenémicos entre los cocos Gram positivos y los bacilos Gram negativos. En los cocos Gram positivos, la resistencia a carbapenémicos es generalmente el resultado de sustituciones en la secuencia de aminoácidos de las PBPs o la adquisición/producción de una nueva PBP resistente a carbapenémicos [130]–[132]. Por su parte, en los bacilos Gram negativos la resistencia a carbapenémicos se asocia con la expresión de β -lactamasas y bombas de eflujo, también con la pérdida de porinas y alteraciones en las PBPs [122], [133], [134]. El mecanismo que ha sido mayormente investigado es la producción de β -lactamasas.

2.6.2.2. CARBAPENEMASAS

Las carbapenemasas son β -lactamasas de clase B, las cuales utilizan Zn^{2+} para inactivar a los β -lactámicos, mientras que las clases A, C y D usan serina como nucleófilo para hidrolizar el enlace β -lactámico. Las carbapenemasas son enzimas específicas con la habilidad de hidrolizar carbapenémicos. La producción de carbapenemasas es la mayor causa de resistencia a carbapenémicos, por lo que la documentación de su distribución en diferentes bacterias es extensa [115]. Un incremento en carbapenemasas de clase A (enzimas KPC y GES), de metalo- β -lactamasas clase B (enzimas VIM, IMP y NDM) y de carbapenemasas clase D (OXA-23, -24/40, -48, -51, -55, -58 y -143) han emergido recientemente [117], [135], [136]. Los

tipos NDM, OXA-48, KPC, IMP y VIM son las carbapenemasas más comunes a nivel global dentro de las *Enterobacteriaceae* [137].

Las β -lactamasas clase A del tipo KPC han sido extensamente reportadas en *K. pneumoniae*. A la fecha, más de veinte diferentes variantes de KPC se han descrito, pero las variantes dominantes continúan siendo KPC-2 y -3 [137]. Estas enzimas proveen resistencia a las penicilinas, carbapenémicos, cefalosporinas, cefamicinas y monobactámicos y son inhibidas por inhibidores de las β -lactamasas como el ácido clavulánico, el tazobactam, el ácido borónico y el avibactam. Las carbapenemasas KPC se han descrito en numerosas enterobacterias, especialmente *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. y *E. coli* [117]. Muchas IAAS se han reportado en Estados Unidos, Colombia, Argentina, Grecia, Italia, Polonia, China e Israel, principalmente causadas por *K. pneumoniae* [137]. Las bacterias productoras de KPC son endémicas en estas regiones [35].

La clase B de las β -lactamasas han sido identificadas en varias especies de enterobacterias incluyendo *K. pneumoniae*, *E. coli* y *Enterobacter* spp. Estas enzimas consisten mayormente en NDM, VIM e IMP, donde el primer tipo es endémico en ciertas regiones de Sur Asia. Por su parte, los organismos productores de IMP se han identificado en China, Japón y Australia, mientras los productores de VIM se encuentran principalmente en Italia y Grecia [35].

La clase D de carbapenemasas encontradas en enterobacterias es representada OXA-48 y sus derivados, la cual fue aislada por primera vez de una *K. pneumoniae* en Turquía [137]. OXA-48 hidroliza eficientemente β -lactámicos de espectro reducido tales como las penicilinas, hidroliza débilmente carbapenémicos y cefalosporinas. Estas enzimas se han encontrado sobre todo en *K. pneumoniae* (comúnmente de pacientes con IAAS) y *E. coli* (mayormente comunitaria).

2.6.3. QUINOLONAS

El descubrimiento del ácido nalidíxico en 1962 y su introducción para el uso clínico en 1967, se marca el inicio de más de cinco décadas de desarrollo y uso de las quinolonas. Sin embargo, siguiendo a la introducción del ácido nalidíxico para el tratamiento de infecciones del tracto urinario causado por enterobacterias, las quinolonas fueron prácticamente abandonadas, hasta el desarrollo de las fluoroquinolonas en los 70s y 80s [138]. Las fluoroquinolonas poseen un espectro extendido y una farmacocinética mejor comparada con compuestos anteriores. En dos décadas, las quinolonas pasaron de ser un grupo pequeño y poco importante de

medicamentos, a ser una clase con ventas multimillonarias anualmente, las cuales continúan en aumento [138]. Estos compuestos se han utilizado en la práctica clínica durante más de una década y durante este tiempo ha crecido el entendimiento de las relaciones entre la estructura y la función de las fluoroquinolonas, lo que ha permitido el desarrollo de incluso mejores compuestos tanto en el espectro antimicrobiano como en la mejora de la farmacocinética, permitiendo dosificaciones de una única vez al día e inclusive la monoterapia. Debido a este incremento del número de agentes que han sido desarrollados, a la fecha más de 10000 moléculas han sido patentadas [139].

Hasta el desarrollo de la flumequina, la primera monofluoroquinolona en 1976, ninguno de los compuestos previos había ofrecido ninguna mejora significativa sobre el ácido nalidíxico. Su rango de actividad abarcó a las *Enterobacteriaceae*, incluyendo cepas resistentes al ácido nalidíxico con actividad útil contra la gonorrea, aunque con un régimen de dos a tres dosis [138].

Las quinolonas se agrupan por generaciones, tomando en cuenta su época de aparición y su espectro antimicrobiano [140], [141]. De esta manera, se encuentran quinolonas desde primera hasta cuarta generación. Las quinolonas de primera generación son activas frente a microorganismos Gram negativos con excepción de *Pseudomonas* spp. y otros bacilos no fermentadores [141]. Las quinolonas de segunda generación también son efectivas frente a bacterias Gram negativas, pero también tienen acción contra *Pseudomonas* spp. e inclusive organismos Gram positivos como *S. aureus*, *S. epidermis* (incluyendo los resistentes a meticilina), *M. catarrhalis* (incluyendo productores de penicilinasas) y micobacterias. La ciprofloxacina es la más activo contra *P. aeruginosa*, sin embargo no es tan eficiente frente a *Acinetobacter* spp. Las de tercera y cuarta generación mantienen su actividad frente a Gram negativos y micobacterias, pero presentan mejor actividad contra Gram positivos, anaerobios y patógenos atípicos [141]. Las quinolonas de cuarta generación, además, son más activas frente a bacterias anaerobias como *Clostridium*.

2.6.3.1. RESISTENCIA A LAS QUINOLONAS

La resistencia a las quinolonas está tradicionalmente mediada por la mutación de los genes cromosómicos que codifican la ADN girasa y/o la topoisomerasa IV o por la mutación de los genes que regulan la expresión de bombas de eflujo [26].

Hasta la fecha, dos mecanismos principales de resistencia han sido descritos: alteraciones en el blanco de las quinolonas y la disminución de la acumulación en el interior de la bacteria debido a la impermeabilidad de la membrana y/o una

sobreexpresión de sistemas de bombas de eflujo. Ambos mecanismos son mediados cromosómicamente. Sin embargo, se han descrito elementos móviles que cargan el gen denominado *qnr* que confiere resistencia a las quinolonas. Desde entonces, se han determinado cuatro grupos de *qnr*: *qnrA*, *qnrB*, *qnrC* y *qnrS*. Estos componentes móviles tienen el potencial de transferirse horizontalmente y fue descrito por primera vez en un aislamiento clínico de *K. pneumoniae* en 1998 [26], [75].

Alteraciones del objetivo: La ADN girasa es una enzima tetramérica compuesta de dos subunidades A y dos subunidades B, codificada por los genes *gyrA* y *gyrB* respectivamente. La principal función de la enzima es catalizar el superenrollamiento negativo del ADN. La topoisomerasa IV también es una enzima A₂B₂, codificada por los genes *parC* y *parE*, las cuales (ParC y ParE) son altamente homologas a GyrA y GyrB, respectivamente. El papel principal de la topoisomerasa IV parece estar asociado con la separación del ADN replicado [75].

Los objetivos de las quinolonas son básicamente diferentes en microorganismos Gram negativos y Gram positivos. Para Gram negativos es la ADN girasa, mientras que para Gram positivos es la topoisomerasa IV. Sin embargo, algunos estudios indican que la ADN girasa puede actuar como objetivo primario en los organismos Gram positivos para algunas quinolonas, como la nadifloxacina [142]–[144]. Además, algunas quinolonas recientemente desarrolladas, como el clinafloxacin y moxifloxacina, tienen afinidad similar para ambos objetivos.

La mayor parte de la literatura que trata sobre los mecanismos de acción y resistencia a las quinolonas se refiere a estudios en *E. coli*. La sustitución de aminoácidos involucrada en el desarrollo de la resistencia para este microorganismo se ha descrito para GyrA/GyrB y ParC/ParE. La prevalencia de mutaciones en sus respectivos genes codificantes se asocia con el origen *in vivo* o *in vitro* de la cepa. Por lo tanto, al comparar la presencia de mutaciones en la ADN girasa de cepas de *E. coli* resistente a quinolonas obtenidas *in vitro*, los resultados mostraron una proporción similar de mutaciones en *gyrA* y *gyrB*, mientras que en estudios de aislamientos clínicos, los resultados mostraron una prevalencia exclusiva de mutaciones en *gyrA*.

2.6.3.1.1. Alteraciones en la ADN girasa

Las alteraciones descritas en la GyrA de *E. coli* se encuentran predominantemente en la llamada región determinante de resistencia a quinolonas (*quinolone-resistance determining region*, QRDR) [75], entre las posiciones 67 y 106. Se ha observado que las mutaciones en los codones 67, 81, 82, 83, 84, 87 y 106 para *gyrA* son responsables

del desarrollo de resistencia a quinolonas en *E. coli*. Sin embargo, algunas de las mutaciones entre la QRDR solo han sido descritas en mutantes obtenidas en laboratorio. Recientemente, la posición 51, una región fuera de la QRDR ha sido propuesta como un nuevo punto de mutación resultante en un decrecimiento de la susceptibilidad a quinolonas [75].

2.6.3.1.2. *Disminución de la captación*

La disminución de la captación de quinolonas puede asociarse con dos factores: un aumento en la impermeabilidad bacteriana a estos agentes antibacterianos o la sobreexpresión de bombas de eflujo. Las quinolonas pueden cruzar la membrana exterior de dos maneras diferentes: a través de porinas específicas o por difusión a través de la bicapa fosfolipídica. El grado de difusión de una quinolona se relaciona y depende de su nivel de hidrofobicidad. Todas las quinolonas pueden cruzar la membrana externa a través de las porinas, pero solo aquellas altamente hidrófobas pueden penetrar a través de la bicapa fosfolipídica. Por lo tanto, alteraciones en la composición de las porinas y/o en los lipopolisacáridos pueden alterar los perfiles de susceptibilidad. En los mutantes con lipopolisacáridos defectuosos, se presentó una mayor susceptibilidad a quinolonas hidrofóbicas comparado con las bacterias que no poseían dichas alteraciones [75].

Alteraciones en la permeabilidad de la membrana están usualmente asociadas con la disminución en la expresión de porinas. Esto se ha descrito tanto en *E. coli* como en otras bacterias Gram negativas [75]. La membrana externa de ciertos microorganismos como *A. baumannii* o *P. aeruginosa* ha sido asociada a la resistencia intrínseca a las quinolonas. Cepas de tipo salvaje de *A. baumannii* muestra MICs a la ciprofloxacina entre los 0.125 y 1 mg/L. En contraste, cepas de tipo salvaje de *E. coli* muestran MICs (concentraciones mínimas inhibitorias, por sus siglas en inglés) para ciprofloxacina entre 0.007 y 0.25 mg/L. Este resultado ha sido interpretado como resistencia intrínseca debido a la sobreexpresión de bombas de eflujo. Interesantemente, esta proporción no se conserva cuando se analiza la MIC del ácido nalidíxico. La membrana externa de *P. aeruginosa* tiene una permeabilidad inespecífica muy baja a moléculas pequeñas hidrófobas, lo que puede explicar la resistencia intrínseca de este microorganismo a las quinolonas. De hecho, la membrana externa de *P. aeruginosa* es de 10 a 100 veces menos permeable a los antimicrobianos que la de *E. coli* [145].

2.6.4. SULFONAMIDAS

Las sulfonamidas fueron los primeros medicamentos con efecto selectivo sobre las bacterias y que pudieron ser usadas sistemáticamente contra infecciones bacterianas [146]. Los primeros experimentos exitosos mostraron que los ratones con infecciones intraperitoneales de *Streptococcus pyogenes* podrían estar protegidos por el compuesto químico protosil (4-sulfonamida-2',4'-diaminoazobenceno).

Las sulfonamidas no se usan con mucha frecuencia actualmente. Inclusive en algunos países no hay medios de distribución para sulfonamidas para uso sistémico [146]. El uso limitado de las sulfonamidas durante varios años ha significado que la presión de selección para la resistencia no ha ido en aumento. Sin embargo, la precisión de los objetivos bacteriales de las sulfonamidas y los cambios constantes en cuanto a resistencia podrían arrojar luz sobre los mecanismos generales para la aparición y posterior propagación de las resistencias bacterianas.

El objetivo de las sulfonamidas, y la base de su selectividad, es la enzima dihidropteroato sintasa (DHPS) catalizadora la condensación del ácido *p*-aminobenzóico y 7,8-dihidro-6-hidroxi metilpterin-pirofosfato para formar el ácido dihidropteróico, el cual es el penúltimo paso en la formación del ácido dihidrofólico.

Las células de los mamíferos no dependen de la síntesis endógena del ácido fólico y generalmente no poseen DHPS. Las células eucariotas superiores pueden utilizar los folatos de la dieta por absorción a través de un sistema de transporte que la mayoría de células procariotas carece. Por esto, los organismos procariotas deben sintetizar los folatos *de novo* a partir de moléculas pequeñas, incluyendo la formación del ácido dihidropteróico catalizada por la DHPS. Esta es la base del efecto selectivo de las sulfonamidas en las bacterias y para su amplio espectro de actividad antimicrobiana. Desde su introducción en 1935, han llegado a usarse contra las infecciones producidas por estreptococos, estafilococos, gonococos y meningococos, al tiempo contra infecciones neumocócicas y del tracto urinario, y contra la fiebre tifoidea [146].

2.6.4.1. MECANISMOS DE RESISTENCIA A LAS SULFONAMIDAS

La resistencia bacteriana a las sulfonamidas puede ocurrir a través de mutaciones del gen cromosómico que codifica la DHPS (*folP*) o mediante la adquisición de un gen alternativo para la DHPS (*sul*) cuyo producto tiene baja afinidad por las sulfonamidas [147]. De los dos mecanismos, los genes *sul* son el mecanismo de resistencia más prevalente a sulfonamidas [148]. Hay tres variantes principales del gen *sul*: *sul1*, *sul2* y

sul3. Estos genes pueden localizarse en transposones o plásmidos de amplio rango de hospedaje autotransferibles o móviles, asociados con múltiples resistencias [149]. Los integrones de clase 1, generalmente llevan el gen *sul1* en su segmento conservado 3' y en cassettes de genes de captura que confieren resistencias adicionales al hospedero. Estos integrones a menudo se encuentran en organismos Gram negativos, pero también se han detectado en plásmido de multirresistencia de *Corynebacteriumk*, supuestamente originario de estiércol. El gen *sul2* era a menudo encontrado en plásmidos de amplio rango de hospederos del grupo IncQ.

El gen de resistencia *sul3* fue descubierto recientemente en un plásmido conjugativo y se logró demostrar que estaba muy extendido entre la *E. coli* patógena de cerdos en Suiza [149].

La resistencia a sulfonamidas tiene una prevalencia a nivel mundial entre los patógenos tanto de animales como de humanos, sin embargo la presencia de los genes *sul* no está igualmente distribuída entre las poblaciones bacterianas [147]. Debido a esto, se han desarrollado e implementado programas de monitoreo de la resistencia antimicrobiana, incluyendo zoonosis e indicadores de la microbiota normal y patógena, en Europa, Norte America y Sur América [147]. Sin embargo, la persistencia y propagación de un gen de resistencia a los antimicrobianos puede ocurrir no solo en la microbiota normal intestinal o por la microbiota patógena, sino también a partir de bacterias ambientales.

2.6.5. AMINOGLUCÓSIDOS

El uso de los aminoglucósidos inicia con la estreptomycin en 1944. Posteriormente, en 1957, aparece la kanamicina, seguida de la gentamicina y la tobramicina, las cuales constituyeron un verdadero avance en el tratamiento de las infecciones causadas por bacilos Gram negativos, por lo cual dichos antimicrobianos se convirtieron en el tratamiento habitual contra estas infecciones [150]. En la década de 1970, los aminoglucósidos semisintéticos demostraron la posibilidad de conseguir compuestos activos contra cepas bacterianas con resistencia frente a la primera generación de aminoglucósidos [151]. El uso extensivo de los aminoglucósidos reveló problemas como la toxicidad, la resistencia bacteriana y la sobreinfección y se comprobó que las modificaciones en el esqueleto de la molécula activa no podían reducir su toxicidad sin disminuir a la vez su actividad antimicrobiana. Es por esto que la investigación y el desarrollo de aminoglucósidos ha llegado a un punto muerto [150].

Sin embargo, en las últimas décadas se ha presentado una intensa actividad investigadora farmacodinámica, experimental y clínica, que ha logrado contemplar a los aminoglucósidos desde una perspectiva bastante diferente a los años 1970 [150], [152], [153].

La actividad antimicrobiana puede ser inhibida por pH ácido y por cationes divalentes, de manera que no logran actuar bien en secreciones bronquiales, abscesos, necrosis tisular y grandes cantidades de detritos orgánicos [150]. Los aminoglucósidos son inactivados químicamente por los β -lactámicos. Entre los aminoglucósidos que se ven más afectados son la gentamicina y la tobramicina, y la inactivación parece ser más intensa con las penicilinas anti *Pseudomonas*. Aún así, la inactivación requiere varias horas *in vitro*, por lo cual su importancia clínica es limitada, no obstante, se recomienda no mezclarlos en una misma administración en la práctica.

Los aminoglucósidos muestran actividad bactericida frente a bacilos Gram negativos aerobios, entre ellos, *Enterobacteriaceae* y bacilos no fermentadores como *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter* spp. Su actividad frente a bacterias Gram positivas incluye estafilococos, enterococos y estreptococos y reside, fundamentalmente, en la sinergia que exhibe asociados a glucopéptidos [150]. Son activos frente a *S. aureus* sensible a meticilina, pero no frente a la mayoría de cepas resistentes a meticilinas. También se usan en combinación con otros antimicrobianos en las infecciones causadas por micobacterias, *Brucella* spp. y *L. monocytogenes*. Los aminoglucósidos no tienen actividad frente a neumococos, *Stenotrophomonas maltophilia*, bacterias anaerobias, rickettsias, hongos ni *Mycoplasma* spp. [154].

Actualmente, la función más importante de los aminoglucósidos residen en el tratamiento de las infecciones graves causadas por bacilos Gram negativos, estafilococos y enterococos. Su utilidad, no obstante, se ve limitada por la aparición de resistencias, la cual está favorecida por el indiscriminado uso de antimicrobianos y, por tanto, susceptible de mostrar gran variación geográfica. La acción de los aminoglucósidos comprende una interacción inicial con la superficie externa de la membrana celular bacteriana, el transporte a través de la membrana interna y la unión a la subunidad 30S de los ribosomas, lo cual inhibe la síntesis de proteínas, lo que conduce a la muerte del organismo [150].

2.6.5.1. RESISTENCIA A AMINOGLUCÓSIDOS

Los mecanismos de resistencia frente a los aminoglucósidos son de tres tipos: modificación enzimática de la molécula, alteración de la difusión y mutación ribosómica

que origina menor afinidad por la subunidad 30S [155]. De todos, la modificación enzimática es el mecanismo más encontrado. Los enterococos muestran una resistencia intrínseca a los aminoglucósidos debida a un transporte deficiente a través de la membrana bacteriana. Este tipo de resistencia se denomina de bajo nivel y puede ser combatida al asociar el aminoglucósido a un antimicrobiano con actividad frente a la pared bacteriana (β -lactámicos o glucopéptidos). También se puede presentar resistencia adquirida, cuya forma más importante es la inactivación mediante la enzima bifuncional (AAC(6')-2''/APH-2, que produce una resistencia de alto nivel frente a los aminoglucósidos, excepto estreptomycin. La resistencia a estreptomycin puede darse por mutación ribosómica o por inactivación enzimática de una adeniltransferasa. Las resistencias de alto nivel se traducen la anulación del sinergismo entre el aminoglucósido y los β -lactámicos o glucopéptidos [150].

Las aminoglucósido 6'-N-acetiltransferasas [AAC(6')s] son enzimas particularmente interesantes porque pueden modificar un número importante de aminoglucósidos de uso clínico, incluyendo la amikacina, gentamicina, netilmicina y tobramicina. Las enzimas de tipo AAC(6')-I confieren resistencia a la amikacina mediante la acetilación del medicamento, mientras que las del tipo AAC(6')-II acetilan gentamicina [48]. Hasta la fecha, 43 genes han sido clonados y caracterizados, desde el nombrado *aac(6')-Ia* hasta el *aacA43*, los cuales codifican enzimas del tipo AAC(6')-I. Los genes que codifican enzimas modificadoras de aminoglucósidos por lo general se encuentran en integrones, secuencias que pueden integrar cassettes genéticos mediante recombinaciones sitio específicas, tanto en plásmidos como en el cromosoma [48].

2.7. DIAGNÓSTICO

La identificación de las bacterias Gram negativas se realiza por métodos microbiológicos estándar, que incluyen: la coloración de Gram y crecimiento en medios selectivos y específicos (MacConkey y EMB) y la utilización de sistemas automatizados de caracterización bioquímica (MicroScan[®], VITEK[®]2, PHOENIX[®]) [156]–[158]. Sin embargo, el empleo de estas técnicas requiere el crecimiento de los microorganismos, puede ser laborioso o llegan a prolongar el diagnóstico definitivo y el tratamiento del paciente [159], [160]. Es debido a esto que muchos laboratorios clínicos han optado por empezar a usar pruebas basadas en material genético y métodos moleculares de diagnóstico para complementar las técnicas microbiológicas, debido a que ofrecen una mayor sensibilidad en un tiempo más corto [160].

2.7.1. LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Este es un método que se aplica en la microbiología clínica, utilizando iniciadores para la amplificación de segmentos específicos de genes únicos o múltiples que estén presentes en los aislamientos bacterianos, como genes específicos de especie, genes de resistencia, entre otros [161], [162]. Existen distintos tipos de PCR que se pueden utilizar en la tipificación de bacterias Gram negativos como son la PCR convencional, PCR múltiple y PCR en tiempo real.

2.8. DESARROLLO DEL PROYECTO

El propósito de esta investigación es aumentar el conocimiento sobre los mecanismos de resistencia presentes en los patógenos, encontrados en pacientes oncológicos del Eje Cafetero, mediante la identificación de la relación existente entre el perfil de resistencia fenotípico y el perfil de resistencia genotípica. Se espera que con la correcta identificación de la resistencia antimicrobiana de los aislamientos se puedan mejorar los procesos de prevención y tratamiento de IAAS.

Este proyecto fue desarrollado por el Grupo de Investigación en Enfermedades Infecciosas (GRIENI) código COL0173481, de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad tecnológica de Pereira y contó con el apoyo financiero de la Vicerrectoría de Investigaciones, Innovación y Extensión de la Universidad Tecnológica de Pereira.

3. METODOLOGÍA

3.1. TIPO DE ESTUDIO

Se realizó un estudio transversal con un componente fenotípico y un componente genotípico de la resistencia antimicrobiana de los aislamientos de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* que se obtuvieron de pacientes oncológicos del Eje Cafetero, en un periodo de recolección comprendido entre mayo de 2016 y noviembre de 2016.

3.2. POBLACIÓN

Se recolectaron los aislamientos de pacientes oncológicos adultos de centros hospitalarios del Eje Cafetero (Pereira, Manizales y Armenia), de quienes se aisló *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*.

3.3. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Aislamientos bacterianos obtenidos de pacientes oncológicos mayores de edad.
- Aislamientos bacterianos de pacientes oncológicos con infecciones ocasionadas por *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* con su respectivo perfil de susceptibilidad antimicrobiana, reportadas por los laboratorios de las instituciones.
- Se estudió un solo aislamiento por paciente del agente etiológico causante de la infección.

3.4. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Aislamientos bacterianos obtenidos de pacientes menores de edad.
- Aislamientos de infecciones polimicrobianas.
- Aislamientos consecutivos de un mismo paciente.

3.5. TAMAÑO DE LA MUESTRA

El número de aislamientos de las bacterias a estudiar se estableció mediante un muestreo aleatorio durante seis meses con recolección de los aislamientos en periodos semanales.

3.6. TOMA DE LA MUESTRA

Los aislamientos de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* fueron obtenidos a partir de los cultivos que rutinariamente fueron procesados por los laboratorios clínicos de cada institución participante en el estudio. Los aislamientos fueron remitidos en medio de transporte AIMES con carbón activado (BD Culture Swab Plus TM Aimes, Bencton Dickinson®) al laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Tecnológica de Pereira.

3.7. IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA Y PERFIL DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA POR SISTEMAS AUTOMATIZADOS

La identificación y perfil de susceptibilidad (antibiograma) se llevó a cabo por el sistema automatizado Phoenix® (BD) del área de microbiología de los laboratorios de cada una de las instituciones participantes. Se tuvieron en cuenta los principales antimicrobianos de cada grupo empleados para el tratamiento de infecciones en pacientes oncológicos por las instituciones participantes. Cada institución entregó el número de aislamientos de bacterias Gram negativas obtenidas semanalmente. Los aislamientos fueron llevados al Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Tecnológica de Pereira en donde fueron sembrados masivamente en agar MacConkey (Merck) e incubados a 37°C durante 24 horas para confirmar su viabilidad, posteriormente fueron sembrados en agar nutritivo (Oxoid) nuevamente e incubados a 37°C durante 24 horas, finalmente dos cuartos de cultivo fueron almacenados en crioviales que contenían caldo BHI con glicerol al 30% para ser preservados a -80°C, los otros dos cuartos fueron resuspendidos cada uno en 1ml de amortiguador TE 1x (Tris-EDTA; pH 8) para ser almacenados a -20°C, hasta utilizarlos en los análisis moleculares.

3.8. TÉCNICAS MOLECULARES

3.8.1. EXTRACCIÓN DE ADN

La extracción del ADN genómico se realizó por el método CTAB descrito por Sambrook et al. 1989 para los aislamientos de *K. pneumoniae* y por kits de extracción de ADN comercial para *E. coli*, *P. aeruginosa* y *A. baumannii*. El proceso se realizó a partir de las muestras almacenadas en TE 1X a -20°C, luego de ser descongeladas, se centrifugaron a 14.000 rpm por 2 minutos, descartando el sobrenadante, quedando un “pellet” o botón. Después, se le adicionó 30 µL de SDS 1% y 3 µL de proteinasa K 20 mg/mL, se mezcló el contenido por inversión del tubo y se incubó por 1 hora a 37°C, en seguida se añadieron 100 µL de NaCl 5M y 80 µL de solución CTAB 1%/NaCl 0,7M, mezclándolo por inversión del tubo e incubándolo a 65°C por 10 minutos. El ADN se

extrajo con un igual volumen de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), se hizo vórtex durante 30 segundos y se centrifugó a 13.000 rpm por 15 minutos, luego se separó la fase acuosa en un tubo estéril sin arrastrar la interfase. La precipitación del ADN se logró con 0,6 volúmenes de isopropanol e inversión repetida. Posteriormente se centrifugó a 13.000 rpm durante 15 minutos a una temperatura de 4°C, descartando el sobrenadante y lavando el precipitado con 500 µL de etanol al 70% frío, el botón se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió con 200µL de TE 1X. La cuantificación del ADN obtenido se hizo por densidad óptica (DO260nm) y la calidad con la relación DO260/280nm empleando el NanoDrop 2000 marca BIORAD®, luego se prepararon soluciones de 50 ng/µl para posterior análisis y se preservaron a –20°C.

3.8.2. CONFIRMACIÓN DE LA ESPECIE POR DETECCIÓN DE LOS GENES ESPECÍFICOS DE ESPECIE

Los aislamientos bacterianos se confirmaron por medio de la amplificación de genes especie específicos por PCR para cada uno de los microorganismos de estudio siguiendo los protocolos de los investigadores mencionados en la tabla 4 y utilizando las cepas de referencia BAA-2146, PAE200, 24Aba205, 24Kpn159 y ATCC® 25922 donadas por el Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana de la universidad El Bosque.

Tabla 4. Iniciadores para la detección de genes especie específicos para *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *A. baumannii*.

GEN	INICIADOR	SECUENCIA (5'-3')	TAMAÑO AMPLICÓN	REFERENCIA
<i>uidA</i> (<i>E. coli</i>)	<i>uidPCR-1</i>	AAA ACG GCA AGA AAA AGC AG	147 pb	[163]
	<i>uidPCR-2</i>	ACG CGT GGT TAC AGT CTT GCG		
<i>Khe</i> (<i>K. pneumoniae</i>)	<i>kheF</i>	GGC GAG GTT TAC GTC TCA AC	272 pb	[164]
	<i>kheR</i>	GTA CTT CTT GTT GGC CTC GC		
<i>oprL</i> (<i>P. aeruginosa</i>)	<i>oprLF</i>	AAT TCG GCA AAT TTG CTG CG	209 pb	[164]
	<i>oprLR</i>	GGA GCT GTC GTA CTC GAA GT		
<i>OmpA</i> (<i>A. baumannii</i>)	<i>OmpA F</i>	TCT TGG TGG TCA CTT GAA GC	86 pb	[165]
	<i>OmpA R</i>	ACT CTT GTG GTT GTG GAG CA		

3.8.3. DETECCIÓN DE LOS GENES DE RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS

Los genes de resistencia fueron detectados por medio de PCR sencillas y/o múltiples las cuales se estandarizaron teniendo en cuenta los protocolos descritos por los autores que aparecen en la tabla 5 con algunas modificaciones, utilizando las cepas de referencia BAA-2146, PAE200, 24Aba205, 24Kpn159 y ATCC® 25922 donadas por el

Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana de la universidad El Bosque. Los análisis genéticos por PCR se realizaron a todos los aislamientos recolectados sin tener en cuenta el perfil de resistencia fenotípico presentado en los antibiogramas.

Tabla 5. Iniciadores para la detección de los genes asociados a resistencia a los antimicrobianos para *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *A. baumannii*.

ENZIMA	INICIADOR	SECUENCIA (5'-3')	TAMAÑO AMPLICON	REFERENCIA
<i>β-lactamasas</i>	<i>blaSHV.SE</i>	ATG CGT TAT ATT CGC CTG TG	747pb	[166]
	<i>blaSHV-AS</i>	TGC TTT GTT ATT CGG GCC AA		
	<i>TEM-164.SE</i>	TCG CCG CAT ACA CTA TTC TCA GAA TGA	445pb	
	<i>TEM-165.AS</i>	ACG CTC ACC GGC TCC AGA TTT AT		
	<i>CTX-M-U1</i>	ATG TGC AGY ACC AGT AAR GTK ATG GC	593pb	
	<i>CTX-M-U2</i>	TGG GTR AAR TAR GTS ACC AGA AYC AGC GG		
<i>Carbapenemasas</i>	<i>KPC-F</i>	TCG CTA AAC TCG AAC AGG	785pb	[167]
	<i>KPC-R</i>	TTA CTG CCC GTT GAC GCC CAA TCC		
	<i>NDM-F</i>	TTG GCC TTG CTG TCC TTG	82pb	
	<i>NDM-R</i>	ACA CCA GTG ACA ATA TCA CCG		
	<i>VIM-F</i>	GTT TGG TCG CAT ATC GCA AC	382pb	
	<i>VIM-R</i>	AAT GCG CAG CAC CAG GAT AG		
	<i>GES-F</i>	CTA TTA CTG GCA GGG ATC G	594pb	
	<i>GES-R</i>	CCT CTC AAT GGT GTG GGT		
	<i>OXA-48-F</i>	TGT TTT TGG TGG CAT CGA T	177pb	
	<i>OXA-48-R</i>	GTA AMR ATG CTT GGT TCG C		
	<i>IMP-F</i>	GAG TGG CTT AAT TCT CRA TC	120pb	
	<i>IMP-R</i>	AAC TAY CCA ATA YRT AAC		
<i>Proteínas de repeticiones de pentapéptidos</i>	<i>qnrA</i>	ATT TCT CAC GCC AGG ATT TG	516pb	[168]
	<i>qnrA</i>	GAT CGG CAA AGG TTA GGT CA		
	<i>qnrB</i>	GAT CGT GAA AGC CAG AAA GG	469pb	
	<i>qnrB</i>	ACG ATG CCT GGT AGT TGT CC		
	<i>qnrS</i>	ACG ACA TTC GTC AAC TGC AA	417pb	
	<i>qnrS</i>	TAA ATT GGC ACC CTG TAG GC		
<i>Dihidropteroato sintasa</i>	<i>sul1-F</i>	CGG CGT GGG CTA CCT GAA CG	433pb	[147]
	<i>sul1-R</i>	GCC GAT CGC GTG AAG TTC CG		
	<i>sul2-F</i>	GCG CTC AAG GCA GAT GGC ATT	293pb	
	<i>sul2-R</i>	GCG TTT GAT ACC GGC ACC CGT		
<i>Aminoglucósido acetil transferasa</i>	<i>aac(6')-Ib-F</i>	TTG CGA TGC TCT ATG AGT GGC TA	482pb	[169]
	<i>aac(6')-Ib-R</i>	CTC GAA TGC CTG GCG TGT TT		

3.9. ESTABLECIMIENTO DE LA CORRELACIÓN QUE EXISTE ENTRE EL TRATAMIENTO EMPÍRICO SELECCIONADO VERSUS EL QUE DEBERÍA SELECCIONARSE SEGÚN LA RESISTENCIA FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA.

Se realizó la correlación entre el tratamiento que se le dio a los pacientes frente a la resistencia fenotípica y genotípica presentada por los aislamientos causantes de infecciones mediante la revisión de las historias clínicas. Se realizaron tablas de comparación para el tratamiento general y para cada especie aislada, usando como parámetro de comparación el test de Fisher, donde un valor de $p \leq 0,05$ se considera estadísticamente significativo.

3.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La información suministrada por cada institución de cada aislamiento entregado para el estudio y los resultados obtenidos se recopilaron en una base de datos de Excel, con ésta se elaboraron tablas de contingencia y se analizaron diferentes correlaciones entre la resistencia fenotípica y genotípica. El análisis de los datos se hizo mediante SPSS versión 22 para Windows (IBM, USA) donde se aplicó pruebas exactas y pruebas para datos pareados y se consideraron estadísticamente significativos, valores de probabilidad (p) $\leq 0,05$ con un intervalo de confianza del 95%.

3.11. DECLARACIÓN BIOÉTICA

Por sus características, este proyecto según la resolución 8430 del Ministerio de Salud de 1993 se definió como una investigación de riesgo mínimo, ya que se utilizaron los aislamientos de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y *A. baumannii* obtenidos de forma rutinaria en los diagnósticos de las infecciones hospitalarias en pacientes oncológicos que fueron tratados de acuerdo al manejo clínico de cada institución participante de la investigación. Los resultados del proyecto no incidieron en el manejo de los pacientes, ya que se generaron tiempo después de la atención y resolución de los pacientes por parte de cada una de las instituciones. El proyecto fue avalado por el Comité de Bioética de la Universidad Tecnológica de Pereira según acta No.11 punto 03 numeral 5 de agosto de 2015, y se contó con el aval del Comité de Ética y/o el aval por el custodio de la información de los pacientes, para este caso el gerente de cada una de las instituciones que aceptaron voluntariamente participar en el estudio. El proyecto fue exonerado de solicitar consentimiento informado de los sujetos de investigación para procesar sus resultados.

3.12. ASPECTOS AMBIENTALES

En la realización del proyecto, el manejo de sustancias contaminantes ambientales fue tratado siguiendo los protocolos de manejo y disposición establecidos en los grupos de investigación y acogiéndose a las recomendaciones de la Universidad Tecnológica de Pereira y de los centros hospitalarios participantes.

El proyecto se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología, de la Facultad de Ciencias de la Salud, de la Universidad Tecnológica de Pereira. Las instalaciones de los laboratorios y manejo de productos químicos y biológicos así como la disposición de desechos tóxicos se encuentran en permanente vigilancia por la oficina de riesgos la institución. El laboratorio de Microbiología ha capacitado y dotado a todo el personal de los laboratorios de los implementos básicos de bioseguridad. Los desechos sólidos y líquidos producidos durante la fase experimental fueron almacenados en bolsas y recipientes especiales, recogidos semanalmente para ser transportados por un vehículo especial a incineración.

3.13. ASPECTOS DE SEGURIDAD E HIGIENE INDUSTRIAL

El impacto ambiental causado por la ejecución de este proyecto es prácticamente cero, puesto que las bacterias son preservadas a -80°C ; los cultivos viejos y no utilizados son destruidos por esterilización (autoclave) y remitidos junto a los otros desechos al incinerador. Los riesgos profesionales fueron minimizados por el estricto cumplimiento de los protocolos establecidos para el manejo y procesamiento de muestras biológicas.

4. RESULTADOS

4.1. RESULTADOS DE LOS DATOS DEMOGRÁFICOS

En el periodo de recolección establecido se obtuvieron 114 aislamientos bacterianos de pacientes oncológicos. En la tabla 6 se muestra número y porcentajes de aislamientos por especie bacteriana, género (sexo), tipo de muestra clínica y lugar de procedencia del paciente. La mayor prevalencia fue para *E. coli* con 35,1% (40/114); no se encontró diferencia estadísticamente significativa en relación al género al realizar una comparación de proporciones ($p=0.4417$; $|z| = 0.7692$); con respecto al tipo de muestra clínica se presentó un mayor porcentaje en sangre con 56,1% (64/114) y mediante una comparación de proporciones se encontraron los siguientes intervalos con un 95% de confianza: sangre [I.C: 95% (0.4653566, 0.6541814)], orina [I.C: 95% (0.2398615, 0.4186322)] y otros [I.C: 95% (0.0621354, 0.1871074)], donde no se encontraron solapamientos. Finalmente, la ciudad que aportó el mayor número de aislamientos fue Pereira con 62,3% (71/114) y se encontraron los siguientes intervalos con un 95% de confianza: Pereira [I.C: 95% (0.5271918, 0.7118758)], Armenia [I.C: 95% (0.16982932, 0.335056)] y Manizales [I.C: 95% (0.0428691, 0.1554058)] con los que no se encontraron relaciones estadísticas entre las tres ciudades. El menor número de aislamientos fue para *A. baumannii* con tan solo cuatro aislamientos siendo el 3,5% del total recolectado, tres de la ciudad de Pereira y uno de Armenia.

Tabla 6. Distribución de los aislamientos por especie, género, tipo de muestra clínica y lugar de procedencia.

Bacteria	Muestras (%)	Género		Tipo de muestra			Ciudad			
		M (%)	F (%)	Sangre (%)	Orina (%)	Otros (%)	PEI (%)	MZL (%)	ARM (%)	N/E (%)
<i>E. coli</i>	40 (35,1)	16 (40)	24 (60)	19 (47,5)	16 (40)	5 (12,5)	25 (62,5)	5 (12,5)	7 (17,5)	3 (7,5)
<i>P. aeruginosa</i>	36 (31,6)	28 (77,8)	8 (22,2)	21 (58,3)	10 (27,8)	5 (13,9)	21 (58,3)	1 (2,8)	12 (33,3)	2 (5,6)
<i>K. pneumoniae</i>	34 (29,9)	13 (38,2)	21 (61,8)	22 (64,7)	10 (29,4)	2 (5,9)	22 (64,7)	4 (11,8)	8 (23,5)	0
<i>A. baumannii</i>	4 (3,5)	2 (50)	2 (50)	2 (50)	1 (25)	1 (25)	3 (75)	0	1 (25)	0
TOTAL (%)	114	59 (51,8)	55 (48,2)	64 (56,1)	37 (32,5)	13 (11,4)	71 (62,3)	10 (8,8)	28 (24,6)	5 (4,4)

M: Masculino; F: Femenino; PEI: Pereira; MZL: Manizales; ARM: Armenia; N/E: No específica

4.2. CONFIRMACIÓN DE LA ESPECIE

Por los métodos automatizados se identificó 35,1% (40/114) aislamientos de *E. coli*, 31,6% (36/114) de *P. aeruginosa*, 29,9% (34/114) de *K. pneumoniae* y 3,5% (4/114) de *A. baumannii*. El 100% de los aislamientos fueron confirmados por PCR con iniciadores especie específicos. En las figuras 3, 4 y 5 se muestran las PCRs sencillas para la detección de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*, respectivamente.

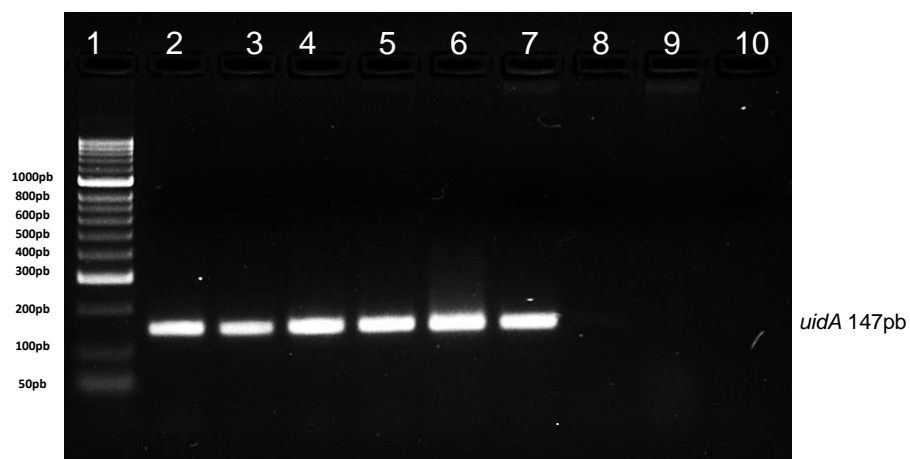


Figura 3. PCR para la detección del gen *uidA* para la identificación de *E. coli*. Carril 1 marcador de peso molecular HyperLadder II. Carril 2 control positivo. Carril 3-8 gen *uidA*. Carril 9 negativo. Carril 10 control negativo.

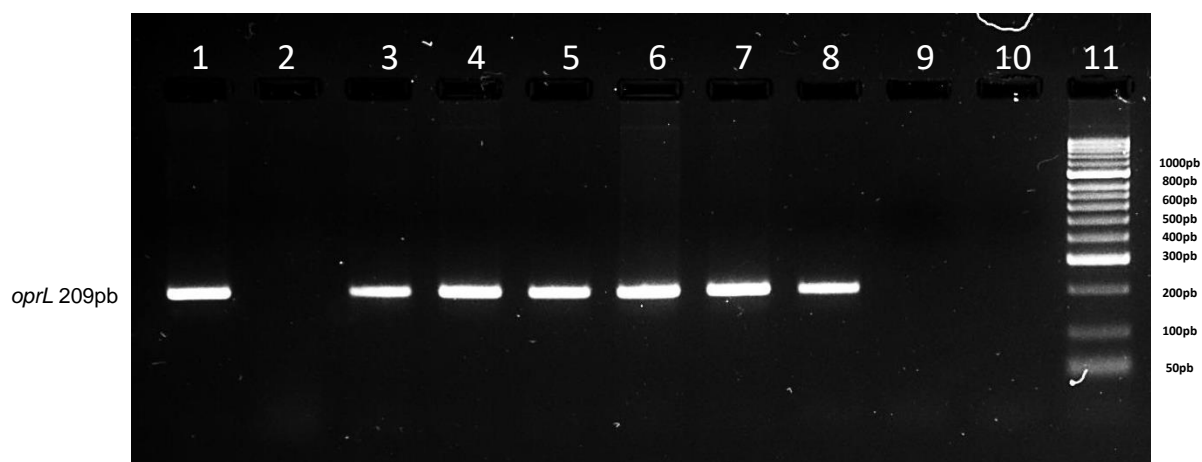


Figura 4. PCR para la detección del gen *oprL* para la identificación de *P. aeruginosa*. Carril 1 control positivo. Carril 2 negativo. Carril 3-8 gen *oprL*. Carril 9 negativo. Carril 10 control negativo. Carril 11 marcador de peso molecular HyperLadder II.

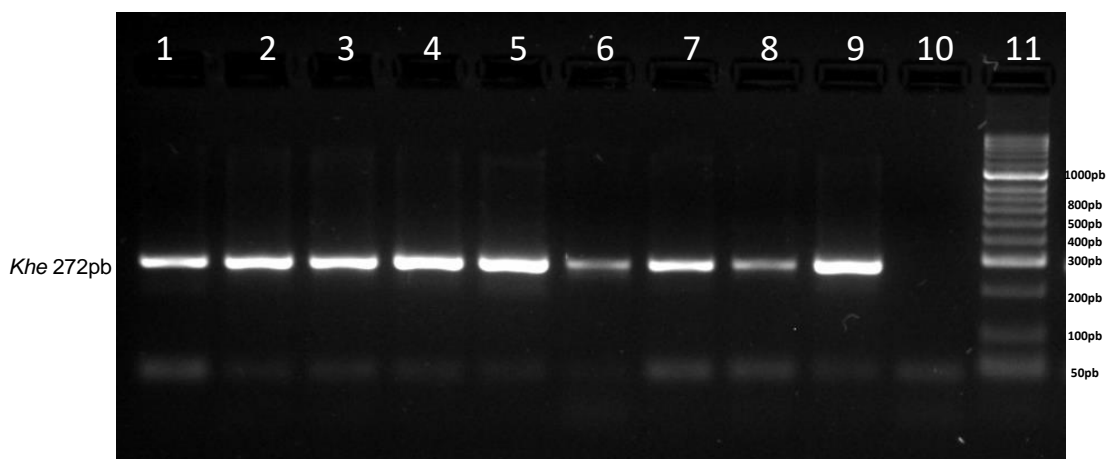


Figura 5. PCR para la detección del gen *Khe* para la identificación de *K. pneumoniae*. Carril 1 control positivo. Carril 2-9 gen *oprL*. Carril 10 control negativo. Carril 11 marcador de peso molecular HyperLadder II.

4.3. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS AISLAMIENTOS

La susceptibilidad antimicrobiana en todos los aislamientos incluyó a 19 antimicrobianos que se dividieron en los siguientes grupos: 14 β -lactámicos (3 carbapenémicos), 2 quinolonas, 1 sulfonamida, y 2 aminoglucósidos, que se muestra en la tabla 7.

Los β -lactámicos presentaron la mayor resistencia fenotípica entre los antimicrobianos estudiados. En general, el 79,8% (91/114) de los aislamientos bacterianos presentaron resistencia al menos a un β -lactámico. El β -lactámico que presentó mayor resistencia en todos los aislamientos fue la ampicilina con un 57% (65/114). El 80% (32/40) de los aislamientos de *E. coli* presentaron resistencia al menos a un β -lactámico, de igual forma presentaron resistencia el 63,9% (23/36) de aislamientos de *P. aeruginosa*, el 97,1% (33/34) de aislamientos de *K. pneumoniae* y el 75% (3/4) de aislamientos de *A. baumannii*.

La mayor resistencia a carbapenémicos, de todos los aislamientos, fue presentada por *P. aeruginosa* con el 55,6% (20/36), seguida por *E. coli* con el 17,5% (7/40) y *K. pneumoniae* con el 5,9% (2/34). *A. baumannii* no presentó resistencia fenotípica a carbapenémicos. El 25,4% (29/114) de todos los aislamientos estudiados presentaron resistencia a carbapenémicos.

Por otra parte, al analizar todos los β -lactámicos, junto con los carbapenémicos, se establece un ligero aumento en la resistencia. El 82,5% (94/114) de todos los aislamientos, el 85% (34/40) de los aislamientos de *E. coli* y el 66,7% (24/36) de los aislamientos de *P. aeruginosa* resultaron resistentes al combinar los grupos, sin embargo no hubo cambios significativos en *K. pneumoniae* y *A. baumannii*.

En cuanto a la resistencia fenotípica a sulfonamidas solo se tuvo en cuenta el trimetoprim-sulfa. El 25,4% (29/114) de los aislamientos fueron resistentes a

sulfonamidas. *E. coli* y *K. pneumoniae* presentaron resistencia a trimetoprim-sulfa, con un 50% (20/40) y 26,5% (9/34) respectivamente. *P. aeruginosa* y *A. baumannii* no tuvieron resistencia fenotípica a sulfonamidas.

En la resistencia a quinolonas, se tuvieron en cuenta dos antimicrobianos: ciprofloxacina y levofloxacina. *E. coli* presentó un 42,5% (14/40) de resistencia para ambos antimicrobianos. El 55,6% (20/36) de los aislamientos de *P. aeruginosa* fue fenotípicamente resistente a quinolonas. Por su parte *K. pneumoniae* presentó un 23,5% (8/34) de resistencia, siendo la resistencia a ciprofloxacina mayor que la resistencia a levofloxacina, 26,5% (9/34) y 11,8% (4/34) respectivamente. *A. baumannii* no presentó resistencia fenotípica a quinolonas.

Tabla 7. Resistencia fenotípica a los antimicrobianos probados por el método automatizado.

Antimicrobiano	<i>E. coli</i> (40)	<i>P. aeruginosa</i> (36)	<i>K. pneumoniae</i> (34)	<i>A. baumannii</i> (4)	TOTAL
β-Lactámicos	32 (80%)	23 (63,9%)	33 (97,1%)	3 (75%)	91 (79,8%)
Amoxicilina-Clavulanato	16 (40)	0	16 (47,1)	0	32 (28,1)
Ampicilina	31 (77,5)	0	33 (97,1)	1 (25%)	65 (57,0)
Aztreonam	1 (2,5)	15 (41,7)	0	0	16 (14,0)
Cefalotina	7 (17,5)	1 (2,8)	4 (11,8)	0	12 (10,5)
Cefazolina	1 (2,5)	0	1 (2,9)	0	2 (1,8)
Cefepime	10 (25)	17 (47,2)	13 (38,2)	0	40 (35,1)
Cefoxitina	8 (20)	0	5 (14,7)	0	13 (11,4)
Ceftazidima	1 (2,5)	14 (38,9)	0	0	15 (13,2)
Ceftriaxona	14 (35)	5 (13,9)	13 (38,2)	1 (25%)	33 (29,0)
Cefuroxima	13 (32,5)	0	15 (44,1)	0	28 (24,6)
Piperacilina-Tazobactam	5 (12,5)	17 (47,2)	7 (20,6)	0	29 (25,4)
Carbapenémicos	7 (17,5%)	20 (55,6%)	2 (5,9%)	0 (0%)	29 (25,4%)
Ertapenem	4 (10)	0	1 (2,9)	0	5 (4,4)
Imipenem	4 (10)	18 (50)	2 (5,9)	0	24 (21,1)
Meropenem	2 (5)	18 (50)	2 (5,9)	0	22 (19,3)
Sulfonamidas	20 (50%)	0 (0%)	9 (26,5%)	0 (0%)	29 (25,4%)
Trimetoprim-Sulfa	20 (50)	0	9 (26,5)	0	29 (25,4)
Quinolonas	17 (42,5%)	20 (55,6%)	8 (23,5%)	0 (0%)	45 (39,5%)
Ciprofloxacina	17 (42,5)	16 (44,4)	9 (26,5)	0	42 (36,8)
Levofloxacina	17 (42,5)	18 (50)	4 (11,8)	0	39 (34,2)
Aminoglucósidos	10 (25%)	15 (41,7%)	9 (26,5%)	0 (0%)	34 (29,8%)
Gentamicina	10 (25)	12 (33,3)	9 (26,5)	0	31 (27,2)
Amikacina	0	13 (36,1)	0	0	13 (11,4)

Finalmente, la resistencia fenotípica a aminoglucósidos se estudió en dos antimicrobianos: gentamicina y amikacina, para una resistencia general de 29,8% (34/114). *E. coli* mostró una resistencia del 25% (10/40) a gentamicina. La mayor

resistencia fenotípica fue de *P. aeruginosa* con el 41,7% (15/36). *K. pneumoniae* solo presentó resistencia a gentamicina con el 26,5% (9/34) mientras que *A. baumannii* no tuvo resistencia fenotípica a aminoglucósidos.

4.4. DETECCIÓN DE LOS GENES DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA

Los resultados de la resistencia a nivel genotípico se muestran en la tabla 8. Se determinó como resistente a cualquier aislamiento que presentó al menos un gen de resistencia para el grupo de antimicrobianos estudiados.

La resistencia genotípica a β -lactámicos se estableció por PCR múltiple de tres genes *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}* y *bla_{CTX-M}*. En la figura 6 se muestra una PCR múltiple para la detección de genes de resistencia a β -lactámicos.



Figura 6. PCR múltiple para los genes de resistencia a β -lactámicos *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}* y *bla_{CTX-M}*. Carril 1 control positivo para los tres genes. Carril 2, 5, 6 y 9 y 10 negativos. Carril 3 y 15 positivos para *bla_{TEM}*. Carril 4 positivo para *bla_{CTX-M}*. Carril 7, 11 y 12 positivos para *bla_{TEM}* y *bla_{CTX-M}*. Carril 13 positivo para *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}* y *bla_{CTX-M}*. Carril 14 positivo para *bla_{SHV}*. Carril 8 marcador de peso molecular HyperLadder II.

El 70,2% de todos los aislamientos estudiados presentaron resistencia genotípica a β -lactámicos. La mayor prevalencia individual, la presentó el gen *bla_{TEM}* con el 38,6% (44/114). A nivel de las especies bacterianas individuales, la mayor resistencia genotípica a β -lactámicos fue presentada por *K. pneumoniae* con el 94,1% (32/34), seguida por *E. coli* con el 80% (32/40), *A. baumannii* con el 50% (2/4) y *P. aeruginosa* con el 38,9% (14/36).

Para los carbapenémicos, se evaluaron seis genes de resistencia en una PCR múltiple. Estos genes fueron *bla_{VIM}*, *bla_{GES}*, *bla_{NDM}*, *bla_{KPC}*, *bla_{OXA-48}* y *bla_{IMP}*. En general, el 29% (33/114) de los aislamientos presentaron resistencia a carbapenémicos y el gen *bla_{VIM}* fue el más común con el 14% (16/114). La mayor resistencia a carbapenémicos fue presentada por *P. aeruginosa* con un 41,7% (15/36), presentando los genes *bla_{VIM}*, *bla_{GES}* y *bla_{KPC}*; seguida por *K. pneumoniae* con el 23,5% (8/34) y finalmente *E. coli* con el 25% (10/40).

Al analizar la resistencia de los β -lactámicos, incluyendo los carbapenémicos, se obtuvo un nivel de resistencia más elevado con el 80,7% (92/114). El 90% (36/40) de *E. coli*, el 58,3 (21/36) de *P. aeruginosa*, el 97% (33/34) de *K. pneumoniae* y el 50% (2/4) de *A. baumannii* presentó resistencia genotípica.

Para sulfonamidas, se consideraron dos variantes del gen *sul*: *sul1* y *sul2*. El 45,6% (52/114) de los aislamientos fueron resistentes a sulfonamidas, y la variante que presentó el mayor porcentaje de detección fue *sul1* con el 28,1% (32/114). El 55% (22/40) de aislamientos de *E. coli* presentó resistencia genotípica, con el 32,5% (13/40) para *sul1* y 37,5% (15/40) para *sul2*. En la tabla 8 se muestra el comportamiento de la resistencia para las otras especies estudiadas. También, se observa que en *P. aeruginosa* solo se detectó la variante del gen *sul1* en los 16 aislamientos. En la figura 7 se muestra una PCR múltiple para los genes de resistencia a sulfonamidas *sul1* y *sul2*.

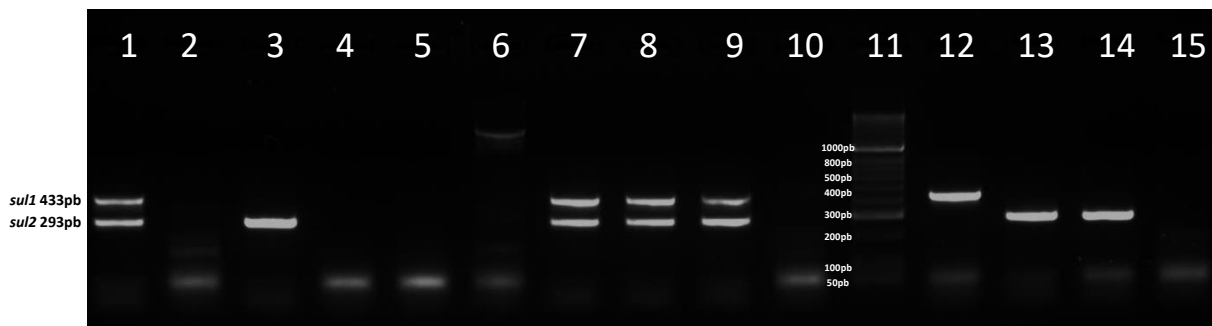


Figura 7. PCR múltiple para los genes de resistencia a sulfonamidas *sul1* y *sul2*. Carril 1 control positivo para los dos genes. Carril 2, 4, 5 6 y 10 negativos. Carril 3, 13 y 14 positivos para *sul2*. Carril 7, 8 y 9 positivos para *sul1* y *sul2*. Carril 12 positivo para *sul1*. Carril 15 control negativo. Carril 11 marcador de peso molecular HyperLadder II.

La resistencia genotípica a quinolonas se determinó a partir de tres variantes del gen *qnr*: *qnrA*, *qnrB* y *qnrS*. Ninguno de los aislamientos presentó resistencia genotípica a quinolonas.

Finalmente, la resistencia a aminoglucósidos fue establecida mediante la detección del gen *aac(6')-Ib*, el cual indicó que el 40,4% (46/114) de aislamientos fueron resistentes. La mayor prevalencia fue para *E. coli* con el 65% (26/40), seguido por *A. baumannii* con el 50% (2/4), *K. pneumoniae* con el 29,4% (10/32) y *P. aeruginosa* con el 22,2% (8/36). El 40,4% (46/114) fue resistente a aminoglucósidos. En la figura 8 se muestra una PCR sencilla para la detección del gen de resistencia a aminoglucósidos *aac(6')-Ib*.

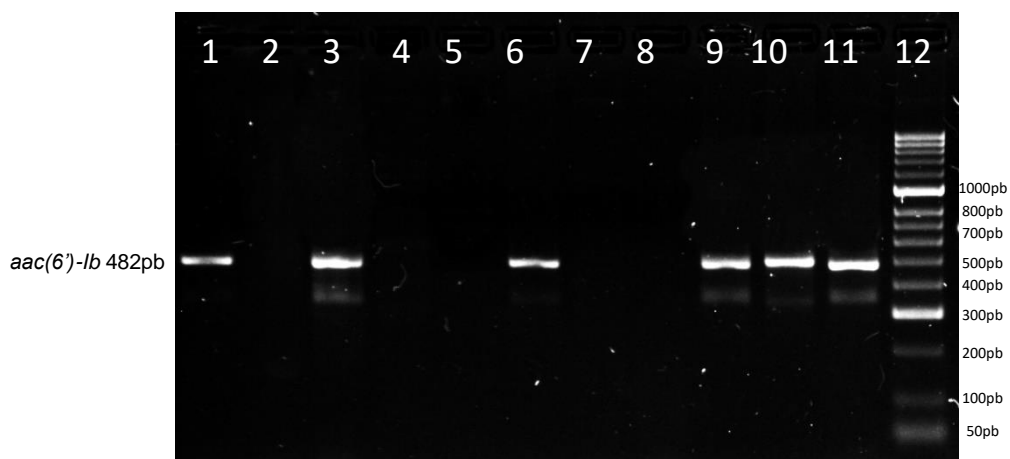


Figura 8. PCR para el gen de resistencia a aminoglucósidos *aac(6')-Ib*. Carril 1 control positivo. Carril 2 control negativo. Carril 3, 6, 9, 10 y 11 positivo para *aac(6')-Ib*. Carril 12 marcador de peso molecular HyperLadder II. Las bandas que aparecen en los carriles negativos son amplificaciones inespecíficas.

Tabla 8. Resistencia genotípica a los antimicrobianos por PCR simples y múltiples

Gen de resistencia	<i>E. coli</i> (40)	<i>P. aeruginosa</i> (36)	<i>K. pneumoniae</i> (34)	<i>A. baumannii</i> (4)	TOTAL
β-lactámicos	32 (80%)	14 (38,9%)	32 (94,1%)	2 (50%)	80 (70,2%)
<i>blaSHV</i>	3 (7,5)	0	29 (85,3)	0	32 (28,1)
<i>blaTEM</i>	24 (60)	9 (25)	9 (26,5)	2 (50)	44 (38,6)
<i>blaCTX-M</i>	11 (27,5)	8 (22,2)	11 (32,4)	0	30 (26,3)
Carbapenémicos	10 (25%)	15 (41,7%)	8 (23,5%)	0 (0%)	33 (29%)
<i>blaVIM</i>	4 (10)	5 (13,9)	7 (20,6)	0	16 (14,0)
<i>blaGES</i>	1 (2,5)	1 (2,8)	0	0	2 (1,8)
<i>blaNDM</i>	0	0	1 (2,9)	0	1 (1,0)
<i>blaKPC</i>	3 (7,5)	10 (27,8)	1 (2,9)	0	14 (12,3)
<i>blaOXA-48</i>	1 (2,5)	0	0	0	1 (1,0)
<i>blaIMP</i>	1 (2,5)	0	0	0	1 (1,0)
Sulfonamidas	22 (55%)	16 (44,4%)	11 (32,4%)	3 (75%)	52 (45,6%)
<i>sul1</i>	13 (32,5)	16 (44,4)	2 (5,9)	1 (25)	32 (28,1)
<i>sul2</i>	15 (37,5)	0	9 (26,5)	2 (50)	26 (22,8)
Quinolonas	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>qnrA</i>	0	0	0	0	0
<i>qnrB</i>	0	0	0	0	0
<i>qnrS</i>	0	0	0	0	0
Aminoglucósidos	26 (65%)	8 (22,2%)	10 (29,4%)	2 (50%)	46 (40,4%)
<i>aac(6')-Ib</i>	26 (100)	8 (100)	10 (100)	2 (100)	46 (40,4)

4.5. ANÁLISIS COMPARATIVO ENTRE LA RESISTENCIA FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA A LOS ANTIMICROBIANOS

En la tabla 9 se describen los resultados de la susceptibilidad antimicrobiana fenotípica y genotípica con el valor de p del test de Fisher, donde un valor de $p \leq 0,05$ se considera estadísticamente significativo. El análisis comparativo entre la resistencia fenotípica y genotípica para cada especie determinó que en *E. coli* existió diferencia significativa para la resistencia a quinolonas ($p < 0,05$) y aminoglucósidos ($p = 0,0003$). *P. aeruginosa* presentó diferencia significativa para tres grupos de antimicrobianos: β -lactámicos ($p = 0,0293$), sulfonamidas ($p < 0,05$) y quinolonas ($p < 0,05$). *K. pneumoniae* se observó diferencia significativa en la resistencia a carbapenémicos ($p = 0,0416$) y quinolonas ($p < 0,0011$), mientras que *A. baumannii* no tuvo diferencias estadísticas significativas para ningún antimicrobiano.

Tabla 9. Análisis estadístico comparativo entre la resistencia fenotípica y genotípica.

		<i>E. coli</i>			<i>P. aeruginosa</i>			<i>K. pneumoniae</i>			<i>A. baumannii</i>		
		R	S	p	R	S	p	R	S	p	R	S	p
β-lactámicos	Fenotipo	32	8	0,6097	23	13	0,0293	33	1	0,5	3	1	0,5
	Genotipo	32	8		14	22		32	2		2	2	
Carbapenémicos	Fenotipo	7	33	0,2928	20	16	0,1729	2	32	0,0416	0	4	1
	Genotipo	10	30		15	21		8	26		0	4	
Sulfonamidas	Fenotipo	20	20	0,4115	0	36	< 0,0500	9	25	0,3953	0	4	0,0714
	Genotipo	22	18		16	20		11	23		3	1	
Quinolonas	Fenotipo	17	23	< 0,0500	15	21	< 0,0500	9	25	0,0011	0	4	1
	Genotipo	0	40		0	36		0	34		0	4	
Aminoglucósidos	Fenotipo	10	30	0,0003	15	21	0,0642	9	25	0,5000	0	4	0,2142
	Genotipo	26	14		8	28		10	24		2	2	

S= Sensible; R= Resistente

4.6. ANÁLISIS DE LA CORRELACIÓN QUE EXISTE ENTRE EL TRATAMIENTO EMPÍRICO SELECCIONADO VERSUS EL QUE DEBERÍA SELECCIONARSE SEGÚN LA RESISTENCIA FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA.

La tabla 10 muestra la comparación realizada a la totalidad de aislamientos teniendo en cuenta el número de aislamientos resistentes y sensibles ante cada antimicrobiano y el porcentaje de acierto entre el antimicrobiano utilizado para el tratamiento empírico y la resistencia *in vitro* presentada. Se presentaron diferencias estadísticamente significativas para β -lactámicos ($p < 0,05$), carbapenémicos ($p = 0,037$), quinolonas ($p = 0,012$) y aminoglucósidos ($p < 0,05$), mientras que sulfonamidas ($p = 0,799$) no presentó diferencias estadísticamente significativas.

Las tablas 11 a 14 muestran los análisis estadísticos resultantes de las comparaciones de la resistencia fenotípica, genotípica y el tratamiento empírico prescrito al paciente infectado, para cada una de las especies bacterianas.

El análisis estadístico mostró que para *E. coli* hubo diferencias estadísticamente significativas respecto a los tratamientos usados basados en la resistencia fenotípica y genotípica en β -lactámicos ($p < 0,05$), carbapenémicos ($p = 0,020$), quinolonas ($p = 0,034$) y aminoglucósidos ($p < 0,05$). En *P. aeruginosa* no presentó diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los grupos de antimicrobianos empleados. *K. pneumoniae* presentó diferencias significativas en el uso de β -lactámicos ($p < 0,05$), carbapenémicos ($p = 0,044$) y aminoglucósidos ($p = 0,007$). Finalmente, *A. baumannii* no presentó diferencias significativas en las comparaciones.

Tabla 10. Análisis estadístico comparativo entre la resistencia fenotípica y genotípica y el tratamiento empírico.

Antimicrobiano	Fenotipo		Tratamiento vs Fenotipo	Genotipo		Tratamiento vs Genotipo	p
	R	S	%	R	S	%	
β-lactámicos	13	46	77,97	48	28	36,84	< 0,05
Aztreonam	0	3	100	4	3	42,86	
Cefalexina				3	1	25	
Cefalotina	0	3	100	3	4	57,14	
Cefazolina	2	1	33,33	26	7	21,21	
Cefepime	1	0	0	1	0	0	
Cefradina				1	0	0	
Ceftriaxona				1	1	50	
Oxacilina	2	5	71,42	10	4	28,57	
Penicilina cristalina				1	0	0	
Piperacilina+tazobactam	9	38	80,85	28	20	41,67	
Carbapenémicos	15	60	80,00	31	44	58,67	0,037
Meropenem	15	60	80	31	44	58,67	
Quinolonas	6	16	72,73	0	21	100,00	0,012
Ciprofloxacina	6	15	71,43	0	21	100	
Levofloxacina	1	2	66,66	0	3	100	
Sulfonamidas	1	2	66,67	1	2	66,67	0,799
Trimetoprim/Sulfametoxazol	1	2	66,66	1	2	66,66	
Aminoglucósidos	0	42	100,00	18	24	57,14	< 0,05
Amikacina	0	41	100	18	23	56,1	
Gentamicina	0	2	100	1	1	50	

R: resistentes, S: sensibles

Tabla 11. Análisis estadístico comparativo entre la resistencia fenotípica y genotípica y el tratamiento empírico de *E. coli*.

E. coli							
Antimicrobiano	Fenotipo		Tratamiento vs Fenotipo	Genotipo		Tratamiento vs Genotipo	p
	R	S	%	R	S	%	
β-lactámicos	2	17	89,47	18	7	28,00	< 0,05
Aztreonam				1	0	0	
Cefalexina				2	1	33,33	
Cefalotina	0	2	100	2	2	50	
Cefazolina	2	1	66,66	10	4	28,57	
Oxacilina				5	0	0	
Piperacilina+tazobactam	1	14	93,33	9	6	40	0,020
Carbapenémicos	0	22	100,00	8	14	63,64	
Meropenem	0	22	100	8	14	63,63	
Quinolonas	4	3	42,86	0	7	100,00	0,034
Ciprofloxacina	4	3	42,86	0	7	100	
Levofloxacina	1	0	0	0	7	100	
Sulfonamidas	1	0	0,00	1	0	0,00	1,000
Trimetoprim/Sulfametoxazol	1	0	0	1	0	0	
Aminoglucósidos	0	13	100,00	8	5	38,46	
Amikacina	0	12	100	8	4	33,33	< 0,05
Gentamicina	0	1	100	0	1	100	

R: resistentes, S: sensibles

Tabla 12. Análisis estadístico comparativo entre la resistencia fenotípica y genotípica y el tratamiento empírico de *P. aeruginosa*.

<i>P. aeruginosa</i>							
Antimicrobiano	Fenotipo		Tratamiento vs Fenotipo	Genotipo		Tratamiento vs Genotipo	<i>p</i>
	R	S	%	R	S	%	
β-lactámicos	5	11	68,75	5	14	73,68	0,519
Aztreonam	0	3	100	1	3	75	
Cefalotina				0	2	100	
Cefazolina				4	2	33,33	
Ceftriaxona				1	1	50	
Oxacilina				4	0	0	
Piperacilina+tazobactam	5	11	68,75	4	12	75	
Carbapenémicos	15	14	48,28	16	13	44,83	0,500
Meropenem	15	14	48,28	16	13	44,83	
Quinolonas	1	7	87,50	0	8	100,00	0,500
Ciprofloxacina	1	7	87,5	0	8	100	

Aminoglucósidos	0	17	100,00	4	13	76,47	0,051
Amikacina	0	17	100	4	13	76,47	

R: resistentes, S: sensibles

Tabla 13. Análisis estadístico comparativo entre la resistencia fenotípica y genotípica y el tratamiento empírico de *K. pneumoniae*.

<i>K. pneumoniae</i>							
Antimicrobiano	Fenotipo		Tratamiento vs Fenotipo	Genotipo		Tratamiento vs Genotipo	<i>p</i>
	R	S	%	R	S	%	
β-lactámicos	4	13	76,47	22	1	4,35	< 0,05
Aztreonam				2	0	0	
Cefalexina				1	0	0	
Cefalotina	0	1	100	1	0	0	
Cefazolina				12	0	0	
Cefepime	1	0	0	1	0	0	
Cefradina				1	0	0	
Oxacilina				4	0	0	
Piperacilina+tazobactam	3	13	81,25	15	1	6,25	
Carbapenémicos	0	22	100,00	7	15	68,18	0,044
Meropenem	0	22	100	7	15	68,18	
Quinolonas	1	6	85,71	0	6	100,00	0,538
Ciprofloxacina	1	5	83,33	0	6	100	
Levofloxacina	0	2	100	0	2	100	
Sulfonamidas	0	2	100,00	0	2	100,00	1,000
Trimetoprim/Sulfametoxazol	0	2	100	0	2	100	
Aminoglucósidos	0	12	100,00	6	6	50,00	0,007
Amikacina	0	12	100	6	6	50	
Gentamicina	0	1	100	1	0	0	

R: resistentes, S: sensibles

Tabla 14. Análisis estadístico comparativo entre la resistencia fenotípica y genotípica y el tratamiento empírico de *A. baumannii*.

A. baumannii							
Antimicrobiano	Fenotipo		Tratamiento vs Fenotipo	Genotipo		Tratamiento vs Genotipo	p
	R	S	%	R	S	%	
β-lactámicos				1	1	50,00	
Cefazolina				0	1	100	
Piperacilina+tazobactam				0	1	100	
Carbapenémicos	0	2	100,00	0	2	100,00	1,000
Meropenem	0	2	100	0	2	100	

R: resistentes, S: sensibles

5. DISCUSIÓN

Las infecciones asociadas a la atención en salud son consideradas un problema de salud pública a nivel mundial, es por esto que es importante conocer la epidemiología de los organismos causantes de IAAS, sobre todo cuando se trata de pacientes vulnerables como lo son los pacientes oncológicos. A su vez, se presenta un mayor impacto en centros médicos de alta complejidad debido al número de pacientes críticamente enfermos, huéspedes inmunocomprometidos, presencia de múltiples enfermedades concomitantes y uso frecuente de dispositivos invasivos, adicionando muchos otros factores como la selección y mal uso de antimicrobianos, la insuficiente aplicación de medidas de prevención y control, una mala higiene de manos, vacíos en los protocolos de limpieza y desinfección, entre otros. Además, los mecanismos de resistencia intrínsecos o adquiridos por las bacterias conllevan a la aparición de multirresistencia [36].

A nivel mundial, la Organización Mundial de la Salud (OMS) plantea estrategias para la contención de la resistencia a los antimicrobianos en las que recomienda intervenciones para retrasar la aparición de nuevas resistencias y a la vez disminuir su diseminación. Esta organización prioriza la vigilancia epidemiológica como el primer paso y parte fundamental de la lucha contra la resistencia antimicrobiana [170].

Por otra parte, en Colombia el estudio de la resistencia en patógenos bacterianos de origen hospitalario inició en la década de los noventa, sin embargo, no fue sino hasta años recientes que se empezaron a llevar a cabo estudios de forma continua que involucran descripciones de la prevalencia de la resistencia y la susceptibilidad antimicrobiana, la caracterización de fenotipos y genotipos, el estudio de costos, la vigilancia de la resistencia antimicrobiana, entre otros factores [36].

En el 2008, el Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia diseñó un modelo de vigilancia en salud pública que incluía las IAAS, la resistencia antimicrobiana y el consumo de antimicrobianos como las problemáticas prioritarias de salud pública a nivel nacional. Posteriormente, en el 2012, el Instituto Nacional de Salud de Colombia (INS) estableció una metodología para la implementación progresiva de estas estrategias de vigilancia y la obligatoriedad de notificación en todo el territorio nacional [171]).

Para el caso de este estudio, epidemiológicamente no se encontraron diferencias estadísticas entre el número de aislamientos respecto al género, con el 51,8% y 48,2%, lo que indica que el género del paciente no tiene influencia en la infección. Ocurre lo contrario con los demás datos recopilados, puesto que los intervalos de confianza encontrados en tipos de muestra y ciudad no muestran solapamientos, con lo cual se determina que estas variables son independientes y cada tipo de muestra y ciudad estudiada representa sus propios datos y no son comparables.

Históricamente en pacientes con cáncer, los bacilos Gram negativos como *E. coli*, *Klebsiella spp.* y *P. aeruginosa* causan las primeras infecciones en pacientes neutropénicos. Estas infecciones ocurren generalmente entre las primeras 2 o 3

semanas después del inicio de la quimioterapia (Zembower, 2014). Sin embargo, a partir de la década de 1980 se ha visto una disminución considerable de bacteremias por bacterias Gram negativas y un incremento en estafilococos y estreptococos, causando entre el 50 y el 75% de las infecciones a nivel mundial en pacientes oncológicos. Pero cuando se consideran los pacientes que permanecen largos periodos hospitalizados, como lo son los pacientes oncológicos, estos son más susceptibles a desarrollar infecciones con bacterias resistentes como *Enterococcus* spp., *Enterobacter* spp., *Acinetobacter* spp. y *Pseudomonas* spp. Este comportamiento es producto del empleo de antimicrobianos de amplio espectro.

Según un estudio realizado en los Estados Unidos en el 2003, las principales bacterias causantes de infecciones en pacientes oncológicos fueron Gram negativas, entre las cuales se encontraba en primer lugar *E. coli*, seguida de *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* [172]. Para el caso de nuestro estudio se presentó una diferencia, aunque *E. coli* continúa siendo la bacteria con mayor prevalencia entre las causantes de infecciones, para el Eje Cafetero se presenta un mayor número de aislamientos de *P. aeruginosa* que de *K. pneumoniae*. Sin embargo, este comportamiento se ha presentado en otra investigación hecha en pacientes oncológicos en Estados Unidos entre el 2000 y el 2010, donde las infecciones por bacterias Gram negativas alcanzó el 43% y la mayor prevalencia fue para *E. coli* seguida de *P. aeruginosa* y posteriormente *K. pneumoniae* [173].

Los porcentajes de resistencia en bacterias Gram negativas son más altos en Suramérica en comparación con los de Europa y Estados Unidos (Villegas, 2007). En un estudio realizado por el programa de vigilancia SENTRY [174], en el que se evaluaron los porcentajes de resistencia de bacilos Gram negativos recolectados en Argentina, Brasil y Chile, se encontró que los porcentajes de resistencia aumentaron en todos estos países [175]. Evidentemente, el notable incremento en la resistencia de los microorganismos Gram negativos se debe especialmente a la presencia de mecanismos que se diseminan con mucha facilidad, como la producción de enzimas de tipo β -lactamasas. El incremento de las bacterias resistentes debido a la producción de enzimas, impermeabilidad, bombas de eflujo, entre otros mecanismos, sobre todo en hospitales de alta complejidad deja solo alternativas terapéuticas tóxicas o costosas, como la colistina. Además, es preocupante la resistencia a fluoroquinolonas, sulfonamidas y aminoglucósidos, cada vez con mayor incidencia.

En 2012, se reportó para los aislamientos de *E. coli* europeos una resistencia a β -lactámicos del 11,9%, mientras que las multirresistencias a β -lactámicos, quinolonas y aminoglucósidos fue del 4,4%. En el continente americano, la OMS reportó que para el 2014 *E. coli* presentó una resistencia a β -lactámicos, incluyendo carbapenémicos, de entre 0-48% y a fluoroquinolonas del 8-58%. Al comparar la resistencia de esta bacteria con la obtenida en este estudio, es evidente el aumento respecto a β -lactámicos con un 80% tanto fenotípica como genotípicamente.

Para el caso de *K. pneumoniae*, en Europa, la resistencia a β -lactámicos alcanzó el 25,6% en el 2014 y la multirresistencia un 59,9%, mientras que en *P. aeruginosa* la

resistencia a β -lactámicos fue del 10% y la multirresistencia del 14%. Por su parte, la resistencia presentada a β -lactámicos en el Eje Cafetero, mostró que *K. pneumoniae* alcanzó un 97,1% respecto al fenotipo y 94,1% en el genotipo y *P. aeruginosa* 63,9% en el fenotipo y 38,9% en el genotipo. Los porcentajes para ambas son superiores a los obtenidos en Europa. Según la OMS, en América *K. pneumoniae* mostró resistencia a β -lactámicos del 4-71% y a carbapenémicos del 0-11%.

Por su parte, el CDC estima que en Estados Unidos, el 19% de las infecciones asociadas a *Enterobacteriaceae* son producidas por bacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido, siendo el 14% de las *E. coli* y el 23% de las *K. pneumoniae* productoras de estas enzimas, sin embargo, en este estudio se encontró en *E. coli* que 80% era productora de β -lactamasas y 25% de carbapenemasas, mientras que en *K. pneumoniae* fue 94,1% productoras de β -lactamasas y 23,5% de carbapenemasas [66].

En Colombia, la Dirección de Redes en Salud Pública mediante el Programa de Vigilancia por Laboratorio de Resistencia Bacteriana de IAAS, en un estudio realizado en 19 departamentos entre 2012 y 2014, reportó que la mayor resistencia carbapenémicos la presenta *K. pneumoniae* con un 80,3%, un resultado superior al obtenido en este estudio (5,9 y 23,5%), de igual forma posee la mayor resistencia aminoglucósidos con un 44,7%, lo cual difiere con el genotipo de este estudio, puesto que la mayor resistencia a aminoglucósidos fue para *E. coli* con 65%. Por su parte, *P. aeruginosa* mostró alta resistencia a carbapenémicos, especialmente a imipenem y meropenem, con un 86,3% y 84,1% respectivamente, valores superiores a los que se presentan en el Eje Cafetero, los cuales se encuentran en el 50% para ambos medicamentos, aunque de forma paralela también presentó alta resistencia a quinolonas con 67,6% y a aminoglucósidos con 54,2%, datos más altos al compararlos tanto a nivel genotípico como fenotípico con este trabajo. Finalmente, *Acinetobacter* spp. presenta en Colombia resistencia a β -lactámicos con un 65,34%, a carbapenémicos con el 94,1%, a quinolonas con el 87,1% y a aminoglucósidos con el 81,2% [171]. Debido al reducido número de aislamientos recolectados en este estudio, sería apresurado comparar los porcentajes obtenidos con los datos nacionales.

Según el Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia, [171] se estableció que la resistencia máxima del perfil genotípico productor de BLEE para bacilos Gram negativos reportado en el país está en 22% para *E. coli*, y 26% para *K. pneumoniae*. Al contrastar estos datos contra los resultados obtenidos en la investigación, 25% para *E. coli* y 23,5% para *K. pneumoniae*, se observa un comportamiento similar. De igual manera, la tasa máxima de resistencia a carbapenémicos en Colombia se encuentra en 28% para *P. aeruginosa*, menor que el reportado en este estudio, 41,7% y 33% para *A. baumannii*, la cual no presentó resistencia genotípica a carbapenémicos.

Reportes de resistencia en Colombia, indican que la β -lactamasa de mayor incidencia es *bla*_{TEM} con el 37,9% de presencia en aislamientos Gram negativos, principalmente en *E. coli* y *A. baumannii*, seguida por *bla*_{CTX-M} con el 13,1% también en estas dos especies. Por su parte, las carbapenemasas más comunes en Colombia son *bla*_{KPC} y

bla_{VIM} principalmente el *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*. Estos resultados reportados son comparables a los encontrados en este estudio, teniendo en cuenta que la β -lactamasa *bla_{SHV}* es constitutiva en *K. pneumoniae*, así que el comportamiento genético a nivel nacional también se ve reflejado en el Eje Cafetero [171].

Controles de infección recientes se han enfocado en la identificación y diseminación de enterobacterias resistentes a los carbapenémicos, las cuales son en mayor medida debidas a carbapenemasas móviles de los grupos serina-carbapenemasas (KPC, GES y OXA) y metalo-carbapenemasas (NDM, VIM e IMP), de las cuales VIM y KPC son las más comunes en el Eje Cafetero, 14% y 12,3% respectivamente. La frecuencia de dicha resistencia también se ha visto incrementada entre los organismos no fermentadores, *P. aeruginosa* y *A. baumannii* [176], un comportamiento que también se evidenció en este estudio debido al alto porcentaje de *P. aeruginosa* productoras de carbapenemasas, 41,7% (15/36).

Para el caso de Latinoamérica, se ha reportado la resistencia a carbapenémicos en Colombia, Perú, Chile, Brasil, Argentina y Venezuela, así como también en Centro América [177]. El programa de vigilancia de antimicrobianos SENTRY ha reportado la presencia de genes de carbapenemasas incluyendo *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}* y *bla_{SPM}* en América Latina, encontrando resistencia en el 21% de los aislamientos de *Acinetobacter* spp y el 45% en *P. aeruginosa*, en tanto, para el Eje Cafetero mediante este estudio se reporta una resistencia fenotípica de 55,6% para *P. aeruginosa* y genotípica de 41,7%; y una ausencia tanto de resistencia fenotípica como genotípica para *A. baumannii*. Además, estudios recientes han mostrado que la resistencia a carbapenémicos en IAAS de América Latina expresa genes de metalo-carbapenemasas de *P. aeruginosa* de México, Argentina, Brasil, Chile y Colombia [177].

Entre las enterobacterias de Colombia, la carbapenemasa más prevalente es KPC (70,3%), seguida de las metalo-carbapenemasas NDM (7%) y VIM (2,8%). En este estudio las carbapenemasas de mayor prevalencia fueron VIM, 14% y KPC, 12,3%. En *Pseudomonas* spp las carbapenemasas más identificadas son VIM y KPC y en el 33,7% de aislamientos resistentes a carbapenémicos se logró una asociación con la producción de carbapenemasas. Si comparamos lo anterior con este estudio se observa que la carbapenemasa más producida por *P. aeruginosa* en el Eje Cafetero es KPC 27,8%, seguida de VIM 13,9%, lo cual concuerda con los datos presentados en el país. En cuanto a *Acinetobacter* spp se observa el predominio de carbapenemasas tipo OXA y se destaca la presencia de NDM, sin embargo en este estudio no se logró la identificación de carbapenemasas para esta bacteria [171].

De manera similar, un estudio realizado en Medellín reportó para 2013 una resistencia del 43,8% y del 39,1% a meropenem e imipenem respectivamente en aislamientos provenientes de unidades de cuidados intensivos (UCI), y del 26,1% y 27,6% a meropenem e imipenem respectivamente, en aislamientos diferentes a UCI [175]. Estos valores se encuentran por encima de los reportados por este trabajo, en los cuales la resistencia a meropenem fue 19,3% y a imipenem 21,1%.

Respecto a la resistencia a carbapenémicos existe un fenómeno interesante en el Eje Cafetero: la alta resistencia presentada por *P. aeruginosa*, siendo del 55,6% y 41,7%, fenotípica y genotípicamente respectivamente. Estos porcentajes son mayores a los reportados anteriormente en América latina, 21% [177], y en Colombia, donde el máximo fue del 39,1% [175]. Esta resistencia se encuentra incluso por encima de los valores presentados por *K. pneumoniae*, 5,9% y 23,5%, fenotípica y genotípicamente, situando a *P. aeruginosa* como el principal aislamiento resistente a carbapenémicos en ésta región del país.

En cuanto a la resistencia a sulfonamidas, se ha reportado la presencia de los genes *sul1* y *sul2* alrededor del mundo. Un estudio realizado en el Reino Unido entre 1991 y 2004 mostró que para *E. coli* el 19% de los aislamientos obtenidos de infecciones urinarias presentaban el gen *sul1*, el 53% el gen *sul2* y el 28% ambos genes [178]. La prevalencia del gen *sul1* ha ido en aumento desde la década de los noventa, mientras que la de *sul2* ha presentado un comportamiento más constante. Por otra parte, en Estados Unidos se ha reportado la resistencia a sulfonamidas en *E. coli* del 36,2%, con un aumento progresivo desde la década de los cincuenta [179]. En los aislamientos de *E. coli* recolectados en el Eje Cafetero se observa una mayor prevalencia respecto a ambos genes, *sul1* 32,5% y *sul2* 37,5%.

Para 1999 el grupo SENTRY reportó para Colombia una resistencia a sulfonamidas para *E. coli* del 56,6%, para *K. pneumoniae* un 46,7% y para *P. aeruginosa* un 100% en un estudio realizado con 212 aislamientos bacterianos de diversos centros hospitalarios a nivel nacional [174]. Aquí se determinó que los organismos Gram negativos eran los más importantes causantes de infecciones siendo *E. coli* el microorganismo de mayor relevancia. Posteriormente, los resultados de la vigilancia nacional de la resistencia antimicrobiana de enterobacterias y bacilos Gram negativos no fermentadores en infecciones asociadas a la atención de salud, Colombia, 2012-2014, mostraron resultados más específicos al comparar la resistencia presentada en UCI frente a otras áreas de hospitalización [171]. Ese estudio reveló que la resistencia a trimetoprim-sulfametoxazol para *E. coli* se encuentra alrededor del 47% en UCI y 45% en otras áreas de hospitalización, para *K. pneumoniae* el 34% en UCI y el 38% en otras áreas de hospitalización, mientras que para *P. aeruginosa* y *A. baumannii* no se tienen datos para este antimicrobiano debido a que no se empleó para el tratamiento [171]. Los datos recolectados en este trabajo muestran una resistencia fenotípica a sulfonamidas del 25,4% y una resistencia genotípica del 45,6%, la resistencia fenotípica a trimetoprim-sulfa para *E. coli* fue del 50%, para *K. pneumoniae* 26,5%, mientras que para *P. aeruginosa* y *A. baumannii* no presentaron datos de resistencia, debido a que este medicamento no es empleado normalmente contra bacilos no fermentadores. En el genotipo se observó un aumento en la prevalencia de la resistencia frente a los presentados en el país siendo para *E. coli* 55%, para *P. aeruginosa* 44,4%, para *K. pneumoniae* 32,4% y para *A. baumannii* 75%. Los datos de este último microorganismo deben ser analizados cuidadosamente puesto que el número de aislamientos obtenidos fue muy bajo. Debido a esta diferencia de datos, se observa una mayor resistencia a nivel genotípico que a nivel fenotípico en el Eje Cafetero, cuyos valores se encuentran,

en general por encima del promedio nacional, lo que indica la presencia en esta zona del país de una mayor prevalencia de aislamientos resistentes a sulfonamidas.

Siguiendo esta línea, se observa que para la resistencia a quinolonas hay dos antimicrobianos principales: ciprofloxacina y levofloxacina. Sin embargo, los resultados promediados reportados por el Instituto Nacional de Salud (INS) solo tienen en cuenta la ciprofloxacina, la cual mostró una resistencia en *E. coli* del 34,7% en UCI y del 33,2% en otros servicios de hospitalización, y para estos mismos servicios *K. pneumoniae* presentó el 20,2% y el 23,9%, *P. aeruginosa* el 24% y el 22,8% y *A. baumannii* el 47,9% y el 45,6% [171]. Fenotípicamente, en el Eje Cafetero se obtuvo una resistencia a quinolonas del 39,5%, siendo *P. aeruginosa* la más resistente, 55,6%, seguido por *E. coli* con 42,5% y *K. pneumoniae* con 23,5%. *A. baumannii* no presentó resistencia fenotípica. Tanto ciprofloxacina como levofloxacina tuvieron porcentajes similares de resistencia, 36,8% y 34,2% respectivamente. Es evidente que la resistencia fenotípica presentada a quinolonas por los aislamientos del Eje Cafetero se encuentra por encima del promedio nacional, sobre todo en el caso de *P. aeruginosa*. Sin embargo, al realizar el estudio genotípico de los aislamientos obtenidos no se encontró la presencia del gen *qnr* en ninguna de sus variables (*qnrA*, *qnrB* y *qnrS*). Esto puede indicar que los factores genéticos que generan la resistencia fenotípica en cada una de las especies incluidas en este estudio pueden deberse a mecanismos alternativos e inclusive aun no descritos.

Fenotípicamente, los aislamientos obtenidos en el Eje Cafetero tuvieron un porcentaje de resistencia a aminoglucósidos del 29,8%, mientras que genotípicamente esta resistencia alcanzó el 40,4%. A nivel fenotípico, *P. aeruginosa* fue el aislamiento con mayor resistencia con el 41,7%, mientras que a nivel genotípico es *E. coli* quien presenta los mayores porcentajes de resistencia alcanzando el 65% de aislamientos con el gen *aac(6')-Ib*. En términos generales se puede observar mayores valores de resistencia a aminoglucósidos que los presentados a nivel nacional, inferior al 20% [171] pero a nivel fenotípico la principal resistencia se da a gentamicina más no a amikacina, siendo resistente a esta solo *P. aeruginosa*. Por último, los resultados promedio de la vigilancia nacional de la resistencia antimicrobiana de enterobacterias y bacilos Gram negativos no fermentadores en infecciones asociadas a la atención de salud, Colombia, 2012-2014 [171] muestran una resistencia a amikacina para *E. coli* del 1% en UCI y del 0,8% en otras áreas de hospitalización, *K. pneumoniae* el 5,7% en UCI y 5,1% en otras áreas de hospitalización, *P. aeruginosa* presentó resistencia a amikacina y gentamicina en UCI del 17% y del 19,9%, respectivamente, mientras que en otros servicios mostró el 13,3% de resistencia a amikacina y el 18,7% a gentamicina. Finalmente, *A. baumannii* presentó resistencia a amikacina en UCI del 36,6%, mientras que en otros servicios de hospitalización mostró el 29,4% de resistencia a este mismo antimicrobiano [171].

La mayoría de datos que se emplearon para la comparación de los resultados fueron basados en estudios de resistencia en UCI, debido a la falta de información existente en pacientes oncológicos, siendo de mayor relevancia los datos aportados por este estudio.

Al comparar estadísticamente la resistencia fenotípica y genotípica encontrada en los aislamientos del Eje Cafetero se encuentra que hay diferencias importantes en varios grupos de antimicrobianos para cada especie incluida en el estudio. *P. aeruginosa* fue la única bacteria que presentó diferencias significativas en el perfil de resistencia a β -lactámicos, para el cual hubo una resistencia mayor a nivel fenotípico que a nivel genotípico, indicando la presencia de más de un mecanismo de resistencia involucrado en la respuesta a los β -lactámicos pero no a los carbapenémicos, sin embargo es *K. pneumoniae* la que presenta una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,0416$). Para esta especie se presenta un mayor número de aislamientos genotípicamente resistentes frente a una menor cantidad de fenotipo resistentes, mostrando que *K. pneumoniae* puede expresar o no sus genes de resistencia y que esto puede llegar a afectar los tratamientos empleados cuando solo se usan medios de identificación fenotípicos.

En el caso de las sulfonamidas, vuelven a observarse diferencias significativas frente a los perfiles de resistencia para *P. aeruginosa* ($p < 0,05$), debido a que no se presentó resistencia fenotípica a este grupo de antimicrobianos, lo cual se explica por el poco uso terapéutico para estas infecciones. Este comportamiento puede llegar a interferir en los tratamientos pues da una falsa expectativa hacia el éxito del uso de sulfonamidas en *P. aeruginosa*. Esto puede deberse a que esta bacteria puede poseer genes de resistencia intrínsecos, lo cual aumentaría la prevalencia de la resistencia a sulfonamidas. De forma indudable, se tienen diferencias estadísticamente significativas al comparar el perfil de resistencia fenotípico y genotípico en *E. coli* ($p < 0,05$), *P. aeruginosa* ($p < 0,05$) y *K. pneumoniae* ($p < 0,0011$) puesto que no se detectó la presencia del gen *qnr* en ninguno de los aislamientos.

Estos resultados permiten inferir que existe uno o más genes implicados en la respuesta a los tratamientos con quinolonas que no están siendo mediados por el grupo del gen *qnr*, los cuales deben ser investigados, determinados y descritos para lograr una mejora en la identificación y elección de antimicrobianos en la lucha contra los microorganismos resistentes. Respecto a los aminoglucósidos solo *E. coli* presentó diferencias significativas ($p = 0,0003$), con una resistencia genotípica mucho mayor que la presentada a nivel de fenotipo. Finalmente, estadísticamente, *A. baumannii* no mostró diferencias significativas, lo cual es en gran medida debido al bajo número de aislamientos recolectados para esta especie. Por tanto, estos datos no arrojan una información real sobre el comportamiento de esta bacteria, tan solo que no es tan común como en otros lugares del país.

El último análisis que se realizó en este estudio se centró en el tratamiento antimicrobiano que se les prescribió a los pacientes con estas infecciones (tratamiento empírico) y se comparó con la resistencia genotípica y fenotípica, teniendo en cuenta el porcentaje de acierto de cada antimicrobiano frente a la resistencia presentada por los aislamientos. Se observa que las mayores diferencias, en términos generales, entre los tratamientos empíricos utilizados y las resistencias *in vitro* de los aislamientos, se presentan para β -lactámicos ($p < 0,05$), carbapenémicos ($p = 0,037$), quinolonas ($p = 0,012$) y aminoglucósidos ($p < 0,05$). Para el caso de los dos primeros grupos, β -

lactámicos y carbapenémicos, se presentaron a nivel genotípico un mayor número de aislamientos resistentes que los detectados fenotípicamente, debido a esto los porcentajes de acierto son menores según la resistencia genotípica frente a la fenotípica, 36,84% y 77,97% respectivamente para β -lactámicos y 58,67% frente a 80% para carbapenémicos. De igual manera ocurre con los aminoglucósidos, para los cuales presenta un 100% de acierto en el tratamiento empírico frente al fenotipo, pero solo llega al 57,14% cuando se hace el análisis genotípico. Para el caso de las quinolonas ocurre lo contrario, puesto que no se encontró presencia del gen *qnr*, a nivel genotípico se consideraron todos los aislamientos como sensibles, sin embargo, debe investigarse el mecanismo genético que está generando la resistencia fenotípica en los aislamientos del Eje Cafetero para tener una comparación más certera.

La menor concordancia entre la resistencia fenotípica y el tratamiento empírico se presenta para quinolonas en *E. coli* con un porcentaje del 42,86%. A su vez, *K. pneumoniae* es el aislamiento con mayores discrepancias en el tratamiento empírico para β -lactámicos a nivel genotípico con tan solo un 4,35% de acierto. Lo anterior demuestra la necesidad de establecer protocolos que tengan en cuenta la susceptibilidad antimicrobiana tanto fenotípica como genotípica, para tener la posibilidad de corregir la conducta terapéutica en el caso del fracaso del tratamiento empírico.

En el caso de *P. aeruginosa* existe una diferencia real entre el tratamiento empírico y los perfiles de resistencia, tan solo en el empleo de aminoglucósidos, donde el porcentaje de acierto frente al fenotipo es del 100% mientras que frente al genotipo disminuye al 76,47%.

Debido al bajo número de aislamientos obtenidos de *A. baumannii* no se encontraron diferencias al comparar los tratamientos empleados contra este microorganismo y sus perfiles de resistencia.

Actualmente, no se encuentran trabajos a nivel nacional que comparen la resistencia *in vitro*, fenotípica y genotípica, con el tratamiento empírico, aún menos en pacientes oncológicos, lo que aumenta el impacto de este tipo de estudios.

6. CONCLUSIONES

Se estableció la prevalencia fenotípica y genotípica de la resistencia antimicrobiana de las bacterias en aislamientos obtenidos de pacientes oncológicos del Eje Cafetero.

Se determinó el perfil fenotípico de resistencia antimicrobiana por medios automatizados, mientras que se detectó el perfil genotípico de resistencia mediante PCRs sencillas y múltiples.

Se presentaron diferencias estadísticamente significativas al comparar los perfiles de resistencia fenotípica y genotípica en *E. coli* para quinolonas y aminoglucósidos, en *P. aeruginosa* para β -lactámicos, sulfonamidas y quinolonas, en *K. pneumoniae* para carbapenémicos y quinolonas. Esto indica que, para estos casos, no hay una correlación entre la resistencia presentada a nivel fenotípico que es detectada por los equipos automatizados y los genes de resistencia que poseen los aislamientos.

Los genes de resistencia de mayor prevalencia encontrados en los aislamientos de este estudio fueron *blaTEM*, *blaSHV* y *sul1*, siendo *E. coli* la que presentó mayor resistencia genotípica a β -lactámicos y sulfonamidas. *P. aeruginosa* mostró la mayor resistencia a carbapenémicos con el gen *blaKPC*.

E. coli y *K. pneumoniae* son los aislamientos con mayores discrepancias en el tratamiento empírico versus los resultados de la resistencia *in vitro* para β -lactámicos a nivel genotípico, 28% y 4,35% de acierto respectivamente, mientras que no presentan discrepancia alguna al compararse con el perfil fenotípico lo cual sugiere la necesidad de establecer protocolos que tengan en cuenta susceptibilidad antimicrobiana para tener la posibilidad de corregir la conducta terapéutica en el caso de fracaso en el tratamiento empírico.

En general, las tasas de resistencia a los antimicrobianos fueron mayores a las reportadas en otras zonas geográficas del país. En los aislamientos estudiados predominó el patrón de la multirresistencia en todas las especies estudiadas.

Este tipo de investigación se realizó por primera vez en tres instituciones del Eje Cafetero que prestan servicios de salud a pacientes oncológicos, convirtiéndolas en referentes para el estudio de IAAS asociadas a Gram negativos en pacientes oncológicos; permitiendo conocer la epidemiología molecular de estos aislamientos, la identificación de la prevalencia de dichos genes y la determinación de los perfiles de resistencia antimicrobiana.

Este tipo de trabajos permite establecer si hay diferencias entre los aislamientos de cada institución y si estas diferencias pueden ser atribuidas a factores de la bacteria, medioambientales o algunos propios de cada zona geográfica.

En nuestra región al igual que en diferentes áreas del país, se está presentando un notable aumento en la resistencia a los antimicrobianos, especialmente en pacientes

vulnerables, como los pacientes oncológicos, por esto es importante la implementación de mejores sistemas de identificación, prevención, tratamiento y control de los patógenos causantes de IAAS a nivel nacional.

7. RECOMENDACIONES

Definir cuál es el mecanismo de resistencia a quinolonas que presentan los aislamientos bacterianos que fueron fenotipo resistente pero, que sin embargo, no portaban el gen *qnr* en ninguna de sus variantes estudiadas (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*).

Realizar los estudios de clonalidad para los aislamientos bacterianos con el fin de determinar la presencia de uno o más clones circulantes y si estos clones son propios de cada ciudad o se encuentran en todo el Eje Cafetero.

Se recomienda realizar análisis adicionales a la resistencia a carbapenémicos presentada por *P. aeruginosa*, debido a la alta prevalencia del gen *bla_{KPC}*, lo que permitiría conocer más a fondo el comportamiento de esta bacteria no solo en el Eje cafetero sino en el resto del país.

Sería de gran importancia e interés realizar en un futuro estudios basados en las técnicas de secuenciación, las cuales presentan ventajas frente a otras técnicas moleculares a nivel de precisión y obtención de resultados en el menor tiempo posible.

Proponer el establecimiento de un protocolo, dentro de los centros hospitalarios, para la determinación pronta de los perfiles genotípicos de resistencia para el mejoramiento de la prescripción del tratamiento contra IAAS a pacientes oncológicos.

Realizar el seguimiento del tratamiento de los pacientes para evaluar el efecto de la resistencia genotípica sobre el desenlace del paciente.

8. BIBLIOGRAFÍA

- [1] M. Palomar Martínez *et al.*, “Prevención de la bacteriemia relacionada con catéteres en UCI mediante una intervención multifactorial. Informe del estudio piloto,” in *Medicina Intensiva*, vol. 34, no. 9, 2010, pp. 581–589.
- [2] T. R. Zembower, “Epidemiology of Infections in Cancer Patients,” *Infect. Complicat. Cancer Patients*, vol. 161, pp. 43–89, 2014.
- [3] J. Klastersky and M. Aoun, “Opportunistic infections in patients with cancer,” *Ann. Oncol.*, vol. 15, no. SUPPL. 4, pp. 329–335, 2004.
- [4] C. Emmanouilides and J. Glaspy, “Opportunistic infections in oncologic patients,” *Hematol. Oncol. Clin. North Am.*, vol. 10, no. 0889–8588 SB–M, pp. 841–860, 1996.
- [5] C.-E. Luyt, N. Bréchet, J.-L. Trouillet, and J. Chastre, “Antibiotic stewardship in the intensive care unit,” *Crit. Care*, vol. 18, no. 5, p. 480, 2014.
- [6] A. F. Shorr, “Review of studies of the impact on Gram-negative bacterial resistance on outcomes in the intensive care unit,” *Crit. Care Med.*, vol. 37, no. 4, pp. 1463–1469, 2009.
- [7] N. A. Maldonado *et al.*, “Tendencias de la resistencia a antibióticos en Medellín y municipios del Área Metropolitana entre 2007-2012: resultados de seis años de vigilancia,” *Biomédica*, vol. 34, no. 3, pp. 433–446, 2014.
- [8] J. Fortún, “Principales infecciones en el paciente oncológico: manejo práctico Principal infections in the oncology patient: practical treatment,” vol. 27, pp. 17–31, 2004.
- [9] K. V. I. Rolston, “Infections in Cancer Patients with Solid Tumors: A Review,” *Infect. Dis. Ther.*, vol. 6, no. 1, pp. 69–83, 2017.
- [10] R. L. Siegel, K. D. Miller, and A. Jemal, “Cancer statistics,” *CA Cancer J Clin.*, vol. 66, no. 1, pp. 7–30, 2016.
- [11] A. Chizuka *et al.*, “Difference between hematological malignancy and Solid tumor research articles published in four major medical journals,” *Leukemia*, vol. 20, no. 10, pp. 1655–1657, 2006.
- [12] E. B. C. Avritscher *et al.*, “Serious postoperative infections following resection of common solid tumors: Outcomes, costs, and impact of hospital surgical volume,” *Support. Care Cancer*, vol. 22, no. 2, pp. 527–535, 2014.
- [13] F. P. Tverdek, K. V. Rolston, and R. F. Chemaly, “Antimicrobial Stewardship in Patients with Cancer,” *Pharmacother. J. Hum. Pharmacol. Drug Ther.*, vol. 32, no. 8, pp. 722–734, 2012.

- [14] I. Rubio and J. Ferreiro, "Infections in the cancer patients . Febrile neutropenia," *Gac Med Bilbao*, vol. 28, no. 101, pp. 53–58, 2004.
- [15] O. YAPICI, F. GUNSEREN, H. YAPICI, A. MERDIN, Ü. Ü. YAYLALI, and F. A. MERDIN, "Evaluation of febrile neutropenic episodes in adult patients with solid tumors," *Mol. Clin. Oncol.*, vol. 4, no. 3, pp. 379–382, 2016.
- [16] T. J. Wiles, R. R. Kulesus, and M. A. Mulvey, "Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*," *Exp. Mol. Pathol.*, vol. 85, no. 1, pp. 11–19, 2008.
- [17] M. A. Croxen and B. B. Finlay, "Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 8, no. 1, pp. 26–38, 2010.
- [18] M. H. Nicolas-Chanoine, X. Bertrand, and J. Y. Madec, "*Escherichia coli* st131, an intriguing clonal group," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 27, no. 3, pp. 543–574, 2014.
- [19] S. Y. Huang, A. Philip, M. D. Richter, S. Gupta, M. L. Lessne, and C. Y. Kim, "Prevention and Management of Infectious Complications of Percutaneous Interventions," *Semin Interv. Radiol*, vol. 32, no. 212, pp. 78–88, 2015.
- [20] K. Bush, G. A. Jacoby, and A. A. Medeiros, "MINIREVIEW A Functional Classification Scheme for β -Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 39, no. 6, pp. 1211–1233, 1995.
- [21] A. Perozo-Mena, M. Castellano-González, M. Ginestre-Pérez, and B. Harris, "Caracterización Molecular y Detección de Betalactamasas de Espectro Extendido en Cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* Aisladas en las Unidades de Cuidados Intensivos de un Hospital Universitario," *Kasmera*, vol. 35, no. 2, pp. 91–106, 2007.
- [22] K. Bush and G. A. Jacoby, "Updated functional classification of β -lactamases," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 54, no. 3, pp. 969–976, 2010.
- [23] D. L. Paterson and R. A. Bonomo, "Extended-Spectrum beta-Lactamases : a Clinical Update," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 18, no. 4, pp. 657–686, 2005.
- [24] S. Mosquito, J. Ruiz, J. L. Bauer, and T. J. Ochoa, "MECANISMOS MOLECULARES DE RESISTENCIA ANTIBIÓTICA EN *Escherichia coli* ASOCIADAS A DIARREA MOLECULAR MECHANISMS OF ANTIBIOTIC RESISTANCE IN *Escherichia coli*-ASSOCIATED DIARRHEA," *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, vol. 28, no. 4, pp. 648–56, 2011.
- [25] A. Michon, N. Allou, F. Chau, I. Podglajen, B. Fantin, and E. Cambau, "Plasmidic qnrA3 enhances *Escherichia coli* fitness in absence of antibiotic exposure," *PLoS One*, vol. 6, no. 9, 2011.

- [26] B. K. Hong, H. P. Chi, J. K. Chung, E. C. Kim, G. A. Jacoby, and D. C. Hooper, "Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants over a 9-year period," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 53, no. 2, pp. 639–645, 2009.
- [27] D. Vicente and E. Pérez-Trallero, "Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol," *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, vol. 28, no. 2, pp. 122–130, 2010.
- [28] H. Arabi *et al.*, "Sulfonamide resistance genes (Sul) M in extended spectrum beta lactamase (ESBL) and non-ESBL producing escherichia coli isolated from Iranian hospitals," *Jundishapur J. Microbiol.*, vol. 8, no. 7, 2015.
- [29] L. S. Tzouveleakis, A. Markogiannakis, M. Psychogiou, P. T. Tassios, and G. L. Daikos, "Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: An evolving crisis of global dimensions," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 25, no. 4, pp. 682–707, 2012.
- [30] C. A. Broberg, M. Palacios, and V. L. Miller, "Klebsiella: a long way to go towards understanding this enigmatic jet-setter," *F1000Prime Rep.*, vol. 6, no. August, 2014.
- [31] L. M. Weiner *et al.*, "Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated with Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011-2014," *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, vol. 37, no. 11, pp. 1288–1301, 2016.
- [32] J. S. Doyle, K. L. Buising, K. A. Thursky, L. J. Worth, and M. J. Richards, "Epidemiology of infections acquired in intensive care units," *Semin. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 32, no. 2, pp. 115–138, 2011.
- [33] P. Sacha *et al.*, "Profiles of phenotype resistance to antibiotic other than β -lactams in *Klebsiella pneumoniae* ESBLs-producers, carrying blaSHVgenes," *Folia Histochem. Cytobiol.*, vol. 48, no. 4, pp. 663–666, 2010.
- [34] H. McDermott *et al.*, "Isolation of NDM-1-producing *klebsiella pnemoniae* in Ireland, July 2011," *Eurosurveillance*, vol. 17, no. 7, pp. 3–5, 2012.
- [35] T. Naas, G. Cuzon, M. V. Villegas, M. F. Lartigue, J. P. Quinn, and P. Nordmann, "Genetic structures at the origin of acquisition of the β -lactamase blaKPC gene," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 52, no. 4, pp. 1257–1263, 2008.
- [36] D. P. López-Velandia, M. I. Torres-Caycedo, and C. F. Prada-Quiroga, "Genes de resistencia en bacilos Gram negativos: Impacto en la salud pública en Colombia," *Rev. Univ. y Salud*, vol. 18, no. 1, pp. 190–202, 2015.
- [37] E. C. Rodríguez *et al.*, "Diseminación de *Klebsiella pneumoniae* productoras de KPC-3 en hospitales de Bogotá durante un periodo de tres años," *Biomédica*, vol. 34, pp. 224–231, 2014.

- [38] G. A. Jacoby, N. Gacharna, T. A. Black, G. H. Miller, and D. C. Hooper, "Temporal appearance of plasmid-mediated quinolone resistance genes," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 53, no. 4, pp. 1665–1666, 2009.
- [39] V. Kumar *et al.*, "Comparative genomics of *Klebsiella pneumoniae* strains with different antibiotic resistance profiles," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 55, no. 9, pp. 4267–4276, 2011.
- [40] R. Almaghrabi *et al.*, "Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains exhibit diversity in aminoglycoside-modifying enzymes, which exert differing effects on plazomicin and other agents," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 58, no. 8, pp. 4443–4451, 2014.
- [41] D. Tafur and V. Villegas, "Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas," *Infectio*, vol. 12, no. 3, pp. 217–226, 2008.
- [42] V. Soheili, B. S. F. Bazzaz, N. Abdollahpour, and F. Hadizadeh, "Investigation of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signaling system for identifying multiple inhibitors using molecular docking and structural analysis methodology," *Microb. Pathog.*, vol. 89, pp. 73–78, 2015.
- [43] V. Aloush, S. Navon-venezia, Y. Seigman-igra, S. Cabili, and Y. Carmeli, "Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* : Risk Factors and Clinical Impact," *Society*, vol. 50, no. 1, pp. 43–48, 2006.
- [44] Y. Carmeli, N. Troillet, A. Karchmer, and M. Samore, "Health and Economic Outcomes of Antibiotic Resistance in," vol. 159, pp. 1127–1132, 1999.
- [45] D. J. Hong *et al.*, "Epidemiology and Characteristics of Metallo- β - Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*," vol. 47, no. 2, pp. 81–97, 2015.
- [46] F. Bert, "Identification of PSE and OXA beta-lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR-restriction fragment length polymorphism," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 50, no. 1, pp. 11–18, 2002.
- [47] E. Martinez *et al.*, "Emerging and existing mechanisms co-operate in generating diverse β -lactam resistance phenotypes in geographically dispersed and genetically disparate *Pseudomonas aeruginosa* strains," *J. Glob. Antimicrob. Resist.*, vol. 1, no. 3, pp. 135–142, 2013.
- [48] T. Tada, T. Miyoshi-Akiyama, K. Shimada, M. Shimojima, and T. Kirikae, "Novel 6'-N-aminoglycoside acetyltransferase AAC(6')-Iaj from a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 57, no. 1, pp. 96–100, 2013.
- [49] H. H. Cho, K. C. Kwon, S. Kim, and S. H. Koo, "Correlation between virulence genotype and fluoroquinolone resistance in carbapenem-resistant *pseudomonas aeruginosa*," *Ann. Lab. Med.*, vol. 34, no. 4, pp. 286–292, 2014.

- [50] I. M. Gould, "The epidemiology of antibiotic resistance," *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 32, no. SUPPL. 1, pp. 2–9, 2008.
- [51] H. Seifert, R. Baginski, A. Schulze, and G. Pulverer, "Antimicrobial Susceptibility of *Acinetobacter* Species," vol. 37, no. 4, pp. 750–753, 1993.
- [52] J. Vila *et al.*, "In Vitro Antimicrobial Production of P-Lactamases, Aminoglycoside-Modifying Enzymes, and Chloramphenicol Acetyltransferase by and Susceptibility of Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*," *Antimicrob. Agents Chemother.*, no. 30, pp. 138–141, 1993.
- [53] A. A. Alsultan, A. Hamouda, B. A. Evans, and S. G. B. Amyes, "*Acinetobacter baumannii*: Emergence of Four Strains with Novel *bla*_{OXA-51-like} Genes in Patients with Diabetes Mellitus," *J. Chemother.*, vol. 21, no. 3, pp. 290–295, 2009.
- [54] T. H. Koh, L. H. Sng, G. C. Y. Wang, L. Y. Hsu, and Y. Zhao, "IMP-4 and OXA β -lactamases in *Acinetobacter baumannii* from Singapore," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 59, no. 4, pp. 627–632, 2007.
- [55] C. H  ritier *et al.*, "Characterization of the Naturally Occurring Oxacillinase of *Acinetobacter baumannii* Characterization of the Naturally Occurring Oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 49, no. 10, pp. 4174–9, 2005.
- [56] J. F. Turton *et al.*, "The role of ISAba1 in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 258, no. 1, pp. 72–77, 2006.
- [57] L. Poirel and P. Nordmann, "Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology," *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 12, no. 9, pp. 826–836, 2006.
- [58] N. C. Gordon and D. W. Wareham, "Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance," *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 35, no. 3, pp. 219–226, 2010.
- [59] L. Dijkshoorn, A. Nemec, and H. Seifert, "An increasing threat in hospitals: Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 5, no. 12, pp. 939–951, 2007.
- [60] R. Moniri, R. K. Farahani, G. Shajari, M. H. N. Shirazi, and A. Ghasemi, "Molecular epidemiology of aminoglycosides resistance in *acinetobacter* spp. with emergence of multidrug-resistant strains," *Iran. J. Public Health*, vol. 39, no. 2, pp. 63–68, 2010.

- [61] A. Nemec, L. Dolzani, S. Brisse, P. Van Den Broek, and L. Dijkshoorn, "Diversity of aminoglycoside-resistance genes and their association with class 1 integrons among strains of pan-European *Acinetobacter baumannii* clones," *J. Med. Microbiol.*, vol. 53, no. 12, pp. 1233–1240, 2004.
- [62] K. F. Kong, L. Schneper, and K. Mathee, "Beta-lactam antibiotics: From antibiosis to resistance and bacteriology," *Apmis*, vol. 118, no. 1, pp. 1–36, 2010.
- [63] J. Lister, "XVI.— A Contribution to the Germ Theory of Putrefaction and other Fermentative Changes, and to the Natural History of *Torulæ* and Bacteria," *Trans. R. Soc. Edinburgh*, vol. 27, no. 3, pp. 313–344, 1875.
- [64] W. Roberts, "Studies on Biogenesis," *Philos. Trans. R. Soc. London*, vol. 164, no. 0, pp. 457–477, 1874.
- [65] J. Tyndall, "Observations on the optical deportment of the atmosphere in reference to the phenomena of putrefaction and infection," *Br. Med. J.*, vol. 1, no. 787, pp. 121–124, 1876.
- [66] M. Dr. . Tom Frieden, MD, "Antibiotic Resistance Threats," *Cdc*, pp. 22–50, 2013.
- [67] R. Bonnet, "Growing group of extended spectrum: the CTX-M enzymes," *Antimicrob Agent Chemother*, vol. 48, no. 1, pp. 1–14, 2004.
- [68] F. T.- Is *et al.*, "crossm Bacterial Pneumonia Pathogens," vol. 2, no. 1, pp. 1–11, 2017.
- [69] W. Yang, I. F. Moore, K. P. Koteva, D. C. Bareich, D. W. Hughes, and G. D. Wright, "TetX is a flavin-dependent monooxygenase conferring resistance to tetracycline antibiotics," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 50, pp. 52346–52352, 2004.
- [70] M. W. Vetting, S. Magnet, E. Nieves, S. L. Roderick, and J. S. Blanchard, "A Bacterial Acetyltransferase Capable of Regioselective N-Acetylation of Antibiotics and Histones," *Can. Field-Naturalist*, vol. 128, no. 2, pp. 189–190, 2014.
- [71] S. Schwarz, C. Kehrenberg, B. Doublet, and A. Cloeckert, "Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol," *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 28, no. 5, pp. 519–542, 2004.
- [72] S. Shaikh, J. Fatima, S. Shakil, S. M. D. Rizvi, and M. A. Kamal, "Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment," *Saudi J. Biol. Sci.*, vol. 22, no. 1, pp. 90–101, 2015.
- [73] A. Brisson-noel, P. Delrieull, D. Samainli, and P. Courvalins, "Inactivation of Lincosaminide Antibiotics in *Staphylococcus*," 1988.
- [74] B. Spratt, "Resistance to antibiotics mediated by target alterations," *Science (80-)*, vol. 264, no. 5157, pp. 388–393, 1994.

- [75] J. Ruiz, "Mechanisms of resistance to quinolones: Target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 51, no. 5, pp. 1109–1117, 2003.
- [76] D. J. Wolter, N. D. Hanson, and P. D. Lister, "Insertional inactivation of *oprD* in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* leading to carbapenem resistance," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 236, no. 1, pp. 137–143, 2004.
- [77] K. Bush and J. F. Fisher, "Epidemiological Expansion, Structural Studies, and Clinical Challenges of New β -Lactamases from Gram-Negative Bacteria," *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 65, no. 1, pp. 455–478, 2011.
- [78] N. Woodford, E. J. Fagan, and M. J. Ellington, "Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum β -lactamases [4]," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 57, no. 1, pp. 154–155, 2006.
- [79] S. A. TESTERO, J. F. FISHER, and S. MOBASHERY, " β -LACTAM ANTIBIOTICS," *Burger's Med. Chem. Drug Discov. Dev.*, vol. 7, pp. 259–404, 2010.
- [80] M. Marín, "Antibióticos betalactámicos," vol. 21, no. 1, pp. 42–54, 2003.
- [81] C. Goffin and J.-M. Ghuysen, "Multimodular Penicillin-Binding Proteins: An Enigmatic Family of Orthologs and Paralogs," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 62, no. 4, pp. 1079–1093, 1998.
- [82] D. L. Perlstein, Y. Zhang, T.-S. Wang, D. E. Kahne, and S. Walker†, "The direction of glycan chain elongation by peptidoglycan glycosyltransferases," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 129, no. 42, 2011.
- [83] J. H. Jeong, Y. S. Kim, C. Rojviriya, S. C. Ha, B. S. Kang, and Y. G. Kim, "Crystal structures of bifunctional penicillin-binding protein 4 from *listeria monocytogenes*," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 57, no. 8, pp. 3507–3512, 2013.
- [84] E. Sauvage, F. Kerff, M. Terrak, J. A. Ayala, and P. Charlier, "The penicillin-binding proteins: Structure and role in peptidoglycan biosynthesis," *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 32, no. 2, pp. 234–258, 2008.
- [85] A. S. Ghosh, C. Chowdhury, and D. E. Nelson, "Physiological functions of D-alanine carboxypeptidases in *Escherichia coli*," *Trends Microbiol.*, vol. 16, no. 7, pp. 309–317, 2008.
- [86] D. L. Popham and K. D. Young, "Role of penicillin-binding proteins in bacterial cell morphogenesis," *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 6, no. 6, pp. 594–599, 2003.
- [87] K. D. Young, "The Selective Value of Bacterial Shape," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 70, no. 3, pp. 660–703, 2006.

- [88] D. E. Nelson and K. D. Young, "Penicillin Binding Protein 5 Affects Cell Diameter , Contour , and Morphology of Escherichia coli Penicillin Binding Protein 5 Affects Cell Diameter , Contour , and Morphology of Escherichia coli," *J. Bacteriol.*, vol. 182, no. 6, pp. 1714–1721, 2000.
- [89] D. E. Nelson and K. D. Young, "Contributions of PBP 5 and dd-Carboxypeptidase Penicillin Binding Proteins to Maintenance of Cell Shape in *Escherichia coli* Contributions of PBP 5 and DD -Carboxypeptidase Penicillin Binding Proteins to Maintenance of Cell Shape in Escherichia coli," *J. Bacteriol.*, vol. 183, no. 10, pp. 3055–3064, 2001.
- [90] K. N. Schurek, R. Wiebe, J. A. Karlowsky, E. Rubinstein, D. J. Hoban, and G. G. Zhanel, "Faropenem: Review of a new oral penem," *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.*, vol. 5, no. 2, pp. 185–198, 2007.
- [91] B. Wiedemann, D. Pfeifle, I. Wiegand, and E. Janas, "beta-Lactamase induction and cell wall recycling in gram-negative bacteria.," *Drug Resist. Updat.*, vol. 1, no. 4, pp. 223–6, 1998.
- [92] D. Pfeifle, E. Janas, and B. Wiedemann, "Role of penicillin-binding proteins in the initiation of the AmpC β - lactamase expression in *Enterobacter cloacae*," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 44, no. 1, pp. 169–172, 2000.
- [93] K. Poole, "Resistance to β -lactam antibiotics," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 61, no. 17, pp. 2200–2223, 2004.
- [94] J. F. Fisher, S. O. Meroueh, and S. Mobashery, "Bacterial resistance to β -lactam antibiotics: Compelling opportunism, compelling opportunity," *Chem. Rev.*, vol. 105, no. 2, pp. 395–424, 2005.
- [95] N. Castro Alarcón, E. D. Carreón Valle, M. E. Moreno Godínez, and L. D. C. Alarcón Romero, "Caracterización molecular de β -lactamasas de espectro extendido en aislamientos clínicos de *Escherichia coli*," *Enfermedades Infecc. y Microbiol.*, vol. 28, no. 3, pp. 114–120, 2008.
- [96] P. E. Coudron, E. S. Moland, and C. C. Sanders, "Occurrence and detection of extended-spectrum ??-lactamases in members of the family Enterobacteriaceae at a Veterans Medical Center: Seek and you may find," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 35, no. 10, pp. 2593–2597, 1997.
- [97] G. A. Jacoby, N. Chow, and K. B. Waites, "Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance," *Society*, vol. 47, no. 2, pp. 559–562, 2003.
- [98] F. K. Majiduddin, I. C. Materon, and T. G. Palzkill, "Molecular analysis of β -lactamase structure and function," *Int. J. Med. Microbiol.*, vol. 292, no. 2, pp. 127–137, 2002.

- [99] R. P. Ambler, "The structure of β -lactamases," *Philos. Trans. R. Soc. London*, vol. 289, pp. 321–331, 1980.
- [100] F. Couture, J. Lachapelle, and R. C. Levesque, "Phylogeny of LCR-1 and OXA-5 with class A and class D β -lactamases," *Mol. Microbiol.*, vol. 6, no. 12, pp. 1693–1705, 1992.
- [101] J. Dufresne, G. Vezina, and R. C. Levesque, "Cloning and expression of the imipenem-hydrolyzing beta-lactamase operon from *Pseudomonas maltophilia* in *Escherichia coli*," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 32, no. 6, pp. 819–826, 1988.
- [102] P. Bradford, "Extended spectrum betalactamase in the 21 century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistant threat," *Clin. Microbiol Rev*, vol. 14, no. 4, pp. 933–951, 2001.
- [103] A. Philippon, R. Labia, and G. Jacoby, "MINIREVIEW Extended-Spectrum Beta-Lactamases," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 33, no. 8, pp. 1131–1136, 1989.
- [104] W. Sougakoff, S. Goussard, and P. Courvalin, "The TEM-3 β -lactamase, which hydrolyzes broad-spectrum cephalosporins, is derived from the TEM-2 penicillinase by two amino acid substitutions," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 56, no. 3, pp. 343–348, 1988.
- [105] M. Perilli *et al.*, "Characterization of a new TEM-derived beta-lactamase produced in a *Serratia marcescens* strain," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 41, no. 11, pp. 2374–82, 1997.
- [106] J. Blazquez, M. I. Morosini, M. C. Negri, and F. Baquero, "Selection of naturally occurring extended-spectrum TEM beta-lactamase variants by fluctuating beta-lactam pressure," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 44, no. 8, pp. 2182–4, 2000.
- [107] P. Mugnier, P. Dubrous, I. Casin, and G. Arlet, "A TEM-Derived Extended-Spectrum β -Lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*," vol. 40, no. 11, pp. 2488–2493, 1996.
- [108] A. Rosenau, B. Cattier, N. Gousset, P. Harriau, A. Philippon, and R. Quentin, "Note *Capnocytophaga ochracea* Characterization of a Plasmid-Encoded Extended-Spectrum TEM-17 β -Lactamase in the Phylum Flavobacter-Bacteroides," vol. 44, no. 3, pp. 760–762, 2000.
- [109] L. Bret, C. Chanal, D. Sirot, R. Labia, and J. Sirot, "Characterization of an inhibitor-resistant enzyme IRT-2 derived from TEM-2 β -lactamase produced by *proteus mirabilis* strains," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 38, no. 2, pp. 183–191, 1996.

- [110] J. Lemozy, D. Sirot, C. Chanal, C. Huc, R. Labia, and H. Dabernat, "First characterization of inhibitor-resistant TEM (IRT) β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* strains. First Characterization of Inhibitor-Resistant TEM (IRT) β -Lactamases in *Klebsiella pneumoniae* Strains," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 33, no. 11, pp. 2580–2582, 1995.
- [111] A. Huletsky, J. R. Knox, and R. C. Levesque, "Role of Ser-238 and Lys-240 in the hydrolysis of third-generation cephalosporins by SHV-type β -lactamases probed by site-directed mutagenesis and three-dimensional modeling," *J. Biol. Chem.*, vol. 268, no. 5, pp. 3690–3697, 1993.
- [112] R. Bonnet *et al.*, "A novel CTX-M β -lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant Enterobacteriaceae isolated in Brazil," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 44, no. 7, pp. 1936–1942, 2000.
- [113] L. S. Tzouveleakis, E. Tzelepi, P. T. Tassios, and N. J. Legakis, "CTX-M-type β -lactamases: An emerging group of extended-spectrum enzymes," *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 14, no. 2, pp. 137–142, 2000.
- [114] L. Ma, Y. Ishii, M. Ishiguro, and H. Matsuzawa, "Cloning and Sequencing of the Gene Encoding Toho-2, a Class A β -Lactamase Preferentially Inhibited by Tazobactam Cloning and Sequencing of the Gene Encoding Toho-2, a Class A β -Lactamase Preferentially Inhibited by Tazobactam," vol. 42, no. 5, pp. 1181–1186, 1998.
- [115] K. M. Papp-Wallace, A. Endimiani, M. A. Taracila, and R. A. Bonomo, "Carbapenems: Past, present, and future," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 55, no. 11, pp. 4943–4960, 2011.
- [116] J. S. Bradley, J. Garau, H. Lode, K. V. I. Rolston, S. E. Wilson, and J. P. Quinn, "Carbapenems in clinical practice: A guide to their use in serious infection," *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 11, no. 2, pp. 93–100, 1999.
- [117] A. M. Queenan and K. Bush, "Carbapenemases: The versatile β -lactamases," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 20, no. 3, pp. 440–458, 2007.
- [118] C. Chouchani, R. Marrakchi, and A. El Salabi, "Evolution of β -lactams resistance in Gram-negative bacteria in Tunisia," *Crit. Rev. Microbiol.*, vol. 37, no. 3, pp. 167–177, 2011.
- [119] P. Gaibani *et al.*, "Rapid increase of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in a large Italian hospital: Surveillance period 1 March - 30 September 2010," *Eurosurveillance*, vol. 16, no. 8, pp. 2–4, 2011.

- [120] R. Gopalakrishnan and D. Sureshkumar, "Changing trends in antimicrobial susceptibility and hospital acquired infections over an 8 year period in a tertiary care hospital in relation to introduction of an infection control programme," *J. Assoc. Physicians India*, vol. 58 Suppl, no. december, pp. 25–31, 2010.
- [121] D. M. Livermore, M. Warner, S. Mushtaq, M. Doumith, J. Zhang, and N. Woodford, "What remains against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae? Evaluation of chloramphenicol, ciprofloxacin, colistin, fosfomycin, minocycline, nitrofurantoin, temocillin and tigecycline," *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 37, no. 5, pp. 415–419, 2011.
- [122] P. Nordmann *et al.*, "Comparative activity of carbapenem testing: the COMPACT study," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 66, no. 5, pp. 1070–1078, 2011.
- [123] F. Rossi, "The challenges of antimicrobial resistance in Brazil," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 52, no. 9, pp. 1138–1143, 2011.
- [124] M. Cole, "'B-Lactams' as B-lactamase inhibitors," *Phil. Trans. R. Soc. L.*, vol. 289, pp. 207–223, 1980.
- [125] J. M. Rodríguez-Martínez, L. Poirel, and P. Nordmann, "Extended-spectrum cephalosporinases in *Pseudomonas aeruginosa*," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 53, no. 5, pp. 1766–1771, 2009.
- [126] T. H. Farmer, B. A. Degnan, and D. J. Payne, "Penetration of beta-lactamase inhibitors into the periplasm of gram-negative bacteria," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 176, no. 1, pp. 11–5, 1999.
- [127] G. N. R. Brown, D. Butterworth, M. cole, G. Hanscomb, J. D. Hood, C. Reading, "Naturally-occurring beta-lactamase inhibitors with antibacterial activity," *J. Antibiot. (Tokyo).*, vol. 29, no. 6, p. 668 to 669, 1976.
- [128] A. S. Limansky, A. S. Limansky, A. M. Viale, and A. M. Viale, "Loss of a 29-Kilodalton Outer Membrane Protein in," *Society*, vol. 40, no. 12, pp. 4776–4778, 2002.
- [129] A. Mena *et al.*, "Characterization of a large outbreak by CTX-M-1-producing *Klebsiella pneumoniae* and mechanisms leading to in vivo carbapenem resistance development," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 44, no. 8, pp. 2831–2837, 2006.
- [130] Y. Katayama, H. Z. Zhang, and H. F. Chambers, "PBP 2a Mutations Producing Very-High-Level Resistance to Beta-Lactams," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 48, no. 2, pp. 453–459, 2004.
- [131] T. Koga, C. Sugihara, M. Kakuta, N. Masuda, E. Namba, and T. Fukuoka, "Affinity of tomopenem (CS-023) for penicillin-binding proteins in *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 53, no. 3, pp. 1238–1241, 2009.

- [132] A. Matsumoto, M. Hosoya, Y. Kawasaki, M. Katayose, K. Kato, and H. Suzuki, "The emergence of drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* and host risk factors for carriage of drug-resistant genes in northeastern Japan," *Jpn. J. Infect. Dis.*, vol. 60, no. 1, pp. 10–13, 2007.
- [133] J. P. Pearson and C. V. a N. Delden, "Active Efflux and Diffusion Are Involved in Transport of," *Society*, vol. 181, no. 4, pp. 1203–1210, 1999.
- [134] D. W. Wareham and D. C. Bean, "In-vitro activity of polymyxin B in combination with imipenem, rifampicin and azithromycin versus multidrug resistant strains of *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 carbapenemases," *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, vol. 5, pp. 1–5, 2006.
- [135] M. K. Satish Gupte, E. Kaur, S. Gupte, and T. Kaur, "Clinical Importance of Carbapenemase Production in Gram-Negative Bacteria," *J. Trop. Dis.*, vol. 03, no. 03, pp. 3–5, 2015.
- [136] T. R. Walsh, "Emerging carbapenemases: A global perspective," *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 36, no. SUPPL. 3, pp. S8–S14, 2010.
- [137] Y. Matsumura and J. D. Pitout, "Recent advances in the laboratory detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae," *Expert Rev. Mol. Diagn.*, vol. 16, no. 7, pp. 783–794, 2016.
- [138] A. M. Emmerson, "The quinolones: decades of development and use," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 51, no. 90001, pp. 13–20, 2003.
- [139] M. I. Andersson, "Development of the quinolones," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 51, no. 90001, pp. 1–11, 2003.
- [140] M. C. Brugueras and M. M. García, "ANTIBACTERIANOS DE ACCIÓN SISTÉMICA. PARTE III. SULFONAMIDAS Y TETRACICLINAS," vol. 15, no. 2, pp. 156–167, 1999.
- [141] M. Cué Brugueras, M. Morejón García, and R. Salup Díaz, "Actualidad de las quinolonas," vol. 39, no. 1, pp. 217–224, 2009.
- [142] X. S. Pan and L. M. Fisher, "Targeting of DNA gyrase in *Streptococcus pneumoniae* by sparfloxacin: Selective targeting of gyrase or topoisomerase IV by quinolones," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 41, no. 2, pp. 471–474, 1997.
- [143] J. Ruiz, J. M. Sierra, M. T. De Anta, and J. Vila, "Characterization of sparfloxacin-resistant mutants of *Staphylococcus aureus* obtained in vitro," *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 18, no. 2, pp. 107–112, 2001.

- [144] M. Takei, H. Fukuda, R. Kishii, and M. Hosaka, "Target preference of 15 quinolones against *Staphylococcus aureus*, based on antibacterial activities and target inhibition," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 45, no. 12, pp. 3544–3547, 2001.
- [145] F. Yoshimura and H. Nikaido, "Permeability of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane to hydrophilic solutes," *J. Bacteriol.*, vol. 152, no. 2, pp. 636–642, 1982.
- [146] O. Sköld, "Sulfonamide resistance: Mechanisms and trends," *Drug Resist. Updat.*, vol. 3, no. 3, pp. 155–160, 2000.
- [147] P. T. Phuong Hoa, L. Nonaka, P. Hung Viet, and S. Suzuki, "Detection of the *sul1*, *sul2*, and *sul3* genes in sulfonamide-resistant bacteria from wastewater and shrimp ponds of north Vietnam," *Sci. Total Environ.*, vol. 405, no. 1–3, pp. 377–384, 2008.
- [148] V. I. Enne, A. King, D. M. Livermore, and L. M. C. Hall, "Sulfonamide resistance in *Haemophilus influenzae* mediated by acquisition of *sul2* or a short insertion in chromosomal *folP*," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 46, no. 6, pp. 1934–1939, 2002.
- [149] H. Heuer and K. Smalla, "Manure and sulfadiazine synergistically increased bacterial antibiotic resistance in soil over at least two months," *Environ. Microbiol.*, vol. 9, no. 3, pp. 657–666, 2007.
- [150] J. Palomino and J. Pachón, "Aminoglucósidos," *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, vol. 21, no. 2, pp. 105–114, 2003.
- [151] M.-P. MINGEOT-LECLERCQ, Y. GLUPCZYNSKI, and P. M. TULKENS¹, "MINIREVIEW Aminoglycosides: Activity and Resistance," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 43, no. 4, pp. 727–737, 1999.
- [152] M. K. Lacy, D. P. Nicolau, C. H. Nightingale, and R. Quintiliani, "The pharmacodynamics of aminoglycosides.," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 27, no. 1, pp. 23–27, 1998.
- [153] W. A. Craig, "State-of-the-Art Clinical Article: Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Parameters: Rationale for Antibacterial Dosing of Mice and Men," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 26, no. 1, pp. 1–10, 1998.
- [154] R. S. Edson and C. L. Terrell, "The Aminoglycosides," *Mayo Clin. Proc.*, vol. 74, no. 5, pp. 519–528, 1999.
- [155] G. H. Miller *et al.*, "The Most Frequent Aminoglycoside Resistance Mechanisms--Changes with Time and Geographic Area: A Reflection of Aminoglycoside Usage Patterns?," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 24, no. Supplement 1, pp. S46–S62, 1997.

- [156] K. S. Chatzigeorgiou, T. N. Sargentanis, S. Tsiodras, S. J. Hamodrakas, and P. G. Bagos, "Phoenix 100 versus Vitek 2 in the identification of gram-positive and gram-negative bacteria: A comprehensive meta-analysis," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 49, no. 9, pp. 3284–3291, 2011.
- [157] P. C. Appelbaum, J. Stavitz, M. S. Bentz, and L. C. Von Kuster, "Four methods for identification of gram-negative nonfermenting rods: Organisms more commonly encountered in clinical specimens," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 12, no. 2, pp. 271–278, 1980.
- [158] T. R. Oberhofer, J. W. Rowen, and G. F. Cunningham, "Characterization and identification of gram-negative, nonfermentative bacteria.," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 5, no. 2, pp. 208–20, 1977.
- [159] M. G. Bergeron and M. Ouellette, "Preventing antibiotic resistance through rapid genotypic identification of bacteria and of their antibiotic resistance genes in the clinical microbiology laboratory.," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 36, no. 8, pp. 2169–72, 1998.
- [160] E. A. Mothershed and A. M. Whitney, "Nucleic acid-based methods for the detection of bacterial pathogens: Present and future considerations for the clinical laboratory," *Clin. Chim. Acta*, vol. 363, no. 1–2, pp. 206–220, 2006.
- [161] D. M. Joshi and D. D. J.D, "Polymerase Chain Reaction : Methods , Principles and," *Int. J. Biomed. Res. Polym.*, vol. 2, no. 1, pp. 81–97, 2010.
- [162] K. Shigemura *et al.*, "Rapid detection and differentiation of Gram-negative and Gram-positive pathogenic bacteria in urine using TaqMan probe," *Clin. Exp. Med.*, vol. 4, no. 4, pp. 196–201, 2005.
- [163] D. Deng *et al.*, "Differentiating enteric *Escherichia coli* from environmental bacteria through the putative glucosyltransferase gene (ycjM)," *Water Res.*, vol. 61, pp. 224–231, 2014.
- [164] Y. P. Wong, K. H. Chua, and K. L. Thong, "One-step species-specific high resolution melting analysis for nosocomial bacteria detection," *J. Microbiol. Methods*, vol. 107, pp. 133–137, 2014.
- [165] M. J. McConnell *et al.*, "Quantitative real-time PCR for detection of *Acinetobacter baumannii* colonization in the hospital environment," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 50, no. 4, pp. 1412–1414, 2012.
- [166] H. J. Monstein, Å. Östholm-Balkhed, M. V. Nilsson, M. Nilsson, K. Dornbusch, and L. E. Nilsson, "Multiplex PCR amplification assay for the detection of blaSHV, blaTEM and blaCTX-M genes in Enterobacteriaceae," *Apmis*, vol. 115, no. 12, pp. 1400–1408, 2007.
- [167] J. Monteiro, R. H. Widen, A. C. C. Pignatari, C. Kubasek, and S. Silbert, "Rapid

- detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 67, no. 4, pp. 906–909, 2012.
- [168] A. Robicsek, J. Strahilevitz, D. F. Sahm, G. A. Jacoby, and D. C. Hooper, "qnr prevalence in ceftazidime-resistant Enterobacteriaceae isolates from the United States," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 50, no. 8, pp. 2872–2874, 2006.
- [169] C. H. Park, A. Robicsek, G. A. Jacoby, D. Sahm, and D. C. Hooper, "Prevalence in the United States of aac(6')-Ib-cr encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 50, no. 11, pp. 3953–3955, 2006.
- [170] World Health Organization, "Communicable Disease Surveillance and Response," *WHO/CDS/CSR/DRS/99.2*, 1999.
- [171] M. V. Ovalle, S. Y. Saavedra, M. N. González, A. M. Hidalgo, C. Duarte, and M. Beltrán, "Resultados de la vigilancia nacional de resistencia antimicrobiana en infecciones asociadas a la atención en salud en enterobacterias y Gram negativos no fermentadores, Colombia 2012-2014," *Biomédica*, vol. 37, no. 4, p. 39, 2017.
- [172] A. Goyal and S. K. Jain, "Prevalence of Nosocomial Infections Associated With Cancer Patients Prevalence of Nosocomial Infections Associated with Cancer Patients," vol. 7, no. October, pp. 126–129, 2015.
- [173] L. R. Sullivan *et al.*, "Epidemiology and risk factors for infections in myelodysplastic syndromes," *Transpl. Infect. Dis.*, vol. 15, no. 6, pp. 652–657, 2013.
- [174] J. A. Robledo, J. López, P. Sierra, C. Robledo, M. A. Pfalle, and R. N. Jones, "Vigilancia Antimicrobiana SENTRY en Colombia," *Infectio*, vol. 3, no. 2, pp. 100–107, 1999.
- [175] J. N. J.-Q. J. Marcela Venegas, G. Roncancio-Villamil, "Acinetobacter baumannii: importancia clínica, mecanismos de resistencia y diagnóstico," *Rev. CES Med.*, vol. 28, no. 2, pp. 233–246, 2014.
- [176] B. Cai *et al.*, "Prevalence of Carbapenem-Resistant Gram-Negative Infections in the United States Predominated by Acinetobacter baumannii and Pseudomonas aeruginosa," *Open Forum Infect. Dis.*, vol. 4, no. 3, pp. 1–7, 2017.
- [177] C. Rocha, N. Reynolds, and M. Simons, "Resistencia emergente a los antibioticos: una amenaza global y un problema critico en el cuidado de la salud," *Rev. Peru Med Exp. Salud Publica*, vol. 32, no. 1, pp. 117–124, 2015.
- [178] D. C. Bean, D. M. Livermore, I. Papa, and L. M. C. Hall, "Resistance among Escherichia coli to sulphonamides and other antimicrobials now little used in man," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 56, no. 5, pp. 962–964, 2005.

- [179] D. A. Tadesse *et al.*, “Antimicrobial Drug Resistance in *Escherichia coli* from Humans and Food Animals, United States, 1950–2002,” *Emerg. Infect. Dis.* •, vol. 18, no. 5, pp. 741–749, 2012.